

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Heterodímeros de receptores de quimioquinas, nuevas unidades funcionales que contribuyen a la plasticidad de la respuesta celular

Tesis Doctoral
Rubén Barroso Rodríguez
Madrid, 2013

Este trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Inmunología y Oncología
del Centro Nacional de Biotecnología bajo la dirección de:
la Dra. Laura Martínez Muñoz y el Dr. Mario Mellado

Este tesis ha sido realizada en elDepartamento de Inmunología y Oncología (DIO)
del Centro Nacional de Biotecnología, y ha sido financiada por una beca FPI
del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.



A mis padres
A mi hermana



Agradecimientos:

Parece que fue ayer cuando vine desde León, a un centro de investigación de Madrid llamado Centro Nacional de Biotecnología. Cuando llegue aquí creí que venía a un laboratorio de un centro de excelencia, y resulta que además me encontré con un laboratorio excelente, tanto a nivel personal como científico. Al final todos los ciclos se acaban y ahora lo único que puedo decir es "GRACIAS".

En primer lugar quiero agradecer a Mario Mellado por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y permitirme así iniciarme en este "mundillo", y como no por las cuestiones científicas que nos hemos planteado durante estos años. Agradezco en segundo lugar y no menos importante a Laura, por guiarme y ayudarme a afrontar los problemas con soltura, por las técnicas que me ha enseñado, y por haberme acogido con tanto cariño, haciéndome sentir como en casa. También a José Miguel, que me ha ayudado siempre que lo he necesitado.

A todos los que pertenecen y han pertenecido en algún momento al "labo 416". Aunque en estos cuatro años ha pasado mucha gente por este laboratorio no me quiero olvidar de nadie porque todos siempre habéis sumado, consiguiendo que el ambiente en el laboratorio sea excelente.

En cuanto a los que quedamos empiezo agradeciéndole a Pili, siempre dispuesta a ayudarnos en cualquier tarea. A Graciela, por ser siempre tan risueña y agradable. A Dimitrí, por las discusiones científicas que tenemos y todos los buenos ratos que pasamos tanto dentro como fuera del labo. A Ricardo, por los consejos tanto científicos como informáticos. Con respecto a los que han dejado el labo en primer lugar quiero agradecer a "Sunni", con quien empecé hace cuatro años por esa simpatía y cercanía que transmites. A Borja, por esas ganas y cercanía que me has demostrado. A Bea, por los buenos ratos que pasamos tanto dentro como fuera del labo. A "Crispu" y Coloma, ejemplo de buenas trabajadoras que siempre se han ofrecido para ayudarme. A Anabel, porque aunque sólo estuvieras como estudiante de master demostraste las ganas y el saber disfrutar de este trabajo. A Sofía por esas ganas de aprender. También a Ana, Gema y Vero...

También quiero agradecer a Yolanda y a su grupo, Laura B. y Julia con quienes he compartido tantos momentos a lo largo de estos años.

La verdad es que he tenido mucha suerte de recalar en este laboratorio, pero también en este departamento, el DIO. Por ello quiero agradecer la gran calidad tanto humana como científica que existe en este departamento.

En especial a Javi, Pedro y Gema por darme consejos tanto profesionales como personales.

No quiero olvidarme tampoco de agradecer a Antonio, que siempre nos ha solucionado el tema de los pedidos, eso sí con alguna colleja de regalo, a Coral, que nos ha agilizado y facilitado realizar los trámites administrativo que necesitábamos, a Lucio que nos ha facilitado, a mí y a más de uno, el trabajo con animales, y como no a Cathy, gracias a ella hemos podido escribir realmente en inglés y no en algo que se le parece.

No me quiero olvidar del servicio de citometría que tanto he utilizado durante estos años, gracias a Mari Carmen, Sara, Pablo, Almudena y Sonia. Tampoco de Anabel Checa que nos soluciona cualquier duda o problema con los microscopios.

Finalmente al grupo de las cañas de los miercoles, que empezaron Abel, Araceli y Pedro y que ahora se ha hecho tan popular entre los nuevos “predoc”, haciendo que la semana sea mas llevadera, aunque muchas veces, como no, se acabe hablando de ciencia.

Fuera del CNB quiero agradecer en primer lugar a Francisco Sánchez-Madrid y a Vera Rocha por su apoyo y colaboración, y también a Joan Salles y a Sergio Barrondo en su disposición a ayudar y colaborar.

Por otro lado también quiero agradecer a mis compañeros de carrera y amigos de León. A Borja que, como yo, está próximo a doctorarse y con quien comparto los momentos de estrés, a Camí, por darme siempre consejos tanto laborales como personales. También a Javier Avendaño por comportarse siempre con “tronío”, y a Mimi, a Diego, a Mario, a Floren, a Bango, a Alfredo... En fin gracias a todos ellos por todos esos buenos momentos que pasamos, sois unos grandes amigos.

Finalmente quiero agradecer a toda mi familia el apoyo que siempre me han brindado. En especial a mis padres y a mi hermana. Siempre me habéis escuchado y valorado, y sin vosotros no lo hubiera conseguido.

En definitiva muchas gracias a todos porque sin vosotros esta empresa que ya finaliza no habría sido posible.

INDICE DE CONTENIDOS:

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>RESUMEN/SUMMARY</u>	7
<u>I.-INTRODUCCIÓN</u>	13
1.-Quimioquinas.....	15
1.1.-Clasificación.....	15
1.2.-Estructura y oligomerización.....	17
2.-Receptores de quimioquinas.....	18
2.1.-Clasificación y estructura.....	18
2.2.-Unión del ligando al receptor.....	20
2.2.1.-Zonas del ligando implicadas con la unión al receptor.....	20
2.2.2.-Zonas del receptor implicadas en la unión al ligando.....	20
2.2.3.-Modelo de unión quimioquina/receptor.....	21
3.-Oligomerización de GPCRs.....	21
3.1.-Evidencias de homo- y hetero-oligomerización.....	21
3.2.-Efectos de la hetero-oligomerización sobre la unión de ligando.....	23
3.3.-Efectos de la hetero-oligomerización sobre la señalización.....	24
3.4.-Heterodimerización de receptores de quimioquinas con otros GPCRs.....	25
4.-Activación del receptor.....	25
4.1.- Principales proteínas implicadas en la señalización.....	25
4.1.1.-Proteína G.....	25
4.1.2.-Fosfolipasas C (PLC).....	26
4.1.3.-Fosfoinositol 3 quinasas (PI3K).....	26
4.1.4.-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).....	26
4.1.5.-GRKs.....	26
5.-Procesos fisio-patológicos en los que participan las quimioquinas y sus receptores.....	27
5.1.-Desarrollo del sistema inmune.....	27
5.1.1.-Órganos linfoides y migración.....	27
5.1.2.-EBI2.....	28
5.1.3.-Implicaciones funcionales.....	29
5.2.-Infección por virus.....	29
5.2.1.-Clasificación y estructura del VIH.....	29
5.2.2.-Mecanismos moleculares implicados en la entrada del VIH en la célula diana.....	30
5.2.3.-Señalización celular tras la unión del VIH-1 a la célula diana.....	31
<u>II.-OBJETIVOS</u>	35
<u>III.-MATERIALES Y MÉTODOS</u>	39
1.-Vectores y construcciones.....	41
2.-Líneas celulares.....	41
3.-Obtención de linfocitos B de ratón.....	41
4.-Anticuerpos utilizados.....	44
5.-Quimioquinas y reactivos.....	44
6.-Obtención de linfocitos B humanos.....	44

7.-Obtención de linfocitos T CD4 ⁺ humanos.....	44
8.-Transfecciones celulares.....	45
9.-Análisis por citometría de flujo.....	45
9.1.-Marcaje extracelular.....	45
9.2.-Cuantificación del número de receptores.....	45
9.3.-Ensayos de internalización y reciclaje de receptor.....	46
9.4.-Ensayos de movilización de calcio intracelular.....	46
9.5.-Ensayos de polimerización de actina.....	46
9.6.-Ensayos de unión de quimioquina biotinilada.....	46
10.-Inmunofluorescencia.....	47
11.-Western Blot.....	47
12.-Extracción de ARN.....	47
13.-RT-qPCR.....	48
14.-Ensayos de migración celular.....	48
15.-Ensayos de fusión celular.....	48
16.-Ensayos de infección con partículas virales NL4-3.....	48
17.-Ensayos de unión de [³⁵ S] GTPγS.....	49
18.-Ensayos cinéticos de unión de gp120-I ¹²⁵	49
19.-Producción, purificación y caracterización de partículas lentivirales.....	49
19.1.-Producción y purificación de partículas lentivirales.....	49
19.2.-Titulación de las partículas lentivirales.....	50
19.3.-Acoplamiento de las partículas lentivirales a bolas de látex.....	50
20.-Ensayos cinéticos por Biacore.....	50
21.-Técnicas de transferencia de energía resonante (RET).....	51
21.1.-Curvas de saturación de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).....	51
21.2.-Curvas de saturación de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer).....	53
21.3.-SRET (Sequential Resonance Energy Transfer).....	54
21.4.-BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation).....	54
21.5.- BRET-BiFC.....	55
21.6.-“Photobleaching” o quemado del aceptor.....	55
22.-Producción y purificación de la proteína AcGFP dimérica.....	56
23.-Total internal reflection microscopy (TIRF-M)	57

IV.-RESULTADOS

61

1.-Análisis del efecto de la coexpresión de EBI2 sobre la función del eje CXCR5/CXCL13.....	63
1.1.-CXCR5 y EBI2 forman homo- y heterodímeros.....	63
1.2.-La expresión de EBI2 modula los homodímeros de CXCR5.....	66
1.3.-EBI2 modula las funciones activadas vía CXCR5.....	68
1.3.1.-EBI2 modula la movilización intracelular de calcio promovida por CXCL13.....	68
1.3.2.-EBI2 modula la activación de las MAPK en respuesta a CXCL13.....	69
1.3.3.-EBI2 reduce la migración en respuesta a CXCL13.....	71
1.4.-EBI2 no afecta los procesos de desensibilización de CXCR5.....	71
1.5.-EBI2 disminuye la activación de proteína G en respuesta a CXCL13.....	73
1.6.-EBI2 modula la afinidad de CXCL13 por CXCR5.....	73
2.-Estudio de la relevancia funcional de la expresión de CCR5 en células CD4 ⁺ /CXCR4 ⁺ sobre la infección por cepas X4 del VIH-1.....	75

2.1.-CD4, CXCR4 y CCR5 forman heterocomplejos en la superficie celular.....	75
2.1.1.-CD4 interacciona con CXCR4 y con CCR5.....	75
2.1.2.-CXCR4 y CCR5 forman heterodímeros.....	75
2.1.3.-CD4, CXCR4 y CCR5 forman heterotrímeros.....	77
2.2.-La expresión de CCR5 altera la conformación de los complejos homodiméricos CXCR4/CXCR4 y de los complejos heterodiméricos CD4/CXCR4.....	79
2.2.1.-CCR5 altera la conformación del complejo homodimérico CXCR4/CXCR4.....	80
2.2.2.-CCR5 altera la conformación del complejo heterodimérico CD4/CXCR4.....	80
2.3.-CCR5 modula la entrada de virus VIH-1 X4 en células que coexpresan CD4/CXCR4.....	82
2.4.-CCR5 reduce la infección por cepas X4 del VIH-1.....	83
2.5.-La expresión de CCR5 modifica el cambio conformacional promovido por gp120 _{IIIB} sobre los complejos CD4/CXCR4.....	84
2.6.-La expresión de CCR5 bloquea la polimerización de actina promovida por gp120 _{IIIB}	84
2.7.-La expresión de CCR5 bloquea la fosforilación de LIMK1 y cofilina promovida por gp120 _{IIIB}	88
2.8.-La expresión de CCR5 bloquea la unión de gp120 _{IIIB} en células que coexpresan CD4 y CXCR4.....	88
3.-Papel del citoesqueleto de actina en la oligomerización de los receptores de quimioquinas.....	93
3.1.-El citoesqueleto de actina regula la agregación de receptores CXCR4 promovida por su ligando CXCL12.....	93
3.2.-CXCL12 promueve internalización de CXCR4 independientemente del citoesqueleto de actina.....	94
3.3.-CXCR4 se organiza en complejos en la superficie celular.....	95
3.4.-La alteración del citoesqueleto de actina modula las funciones mediadas por CXCL12.....	99
<u>V.-DISCUSIÓN.</u>	103
1.-Relevancia funcional de las diferentes conformaciones adoptadas por los receptores de quimioquinas y otros GPCRs.....	105
1.1.-Papel modulador de EBI2 en la migración de los linfocitos B vía CXCR5.....	105
1.2.-Papel de CCR5 como inhibidor de la infección de cepas X4 del VIH-1.....	
2.-Papel que juega el citoesqueleto de actina en la formación de los complejos oligoméricos de los receptores de quimioquinas.....	108
3.-Discusión global.....	110
<u>VI.-CONCLUSIONES</u>	115
<u>VII.-BIBLIOGRAFÍA</u>	119
<u>VIII.-ANEXO I</u>	139

The background consists of several overlapping rectangular blocks of different shades of blue. A large light blue block covers the top half. Below it, a medium blue block contains the text. To the left of this, a light blue block extends from the top. At the bottom, a large, vibrant blue block covers the lower half of the page.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

APC: Células presentadoras de antígenos (del inglés: “antigen-presenting cell”)

ARN: Ácido ribonucleico

BCR: Receptor de células B (del inglés: “B cell receptor”)

BiFC: Fluorescencia por complementación bimolecular (del inglés: “bimolecular fluorescence complementation”)

BRET: Transferencia de energía resonante bioluminiscente (del inglés: “bioluminescence resonance energy transfer”)

BSA: Albúmina de suero bovina (del inglés: “bovine serum albumine”)

CFP: Proteína fluorescente cian (del inglés: “cyan fluorescent protein”)

CRS1: Primer sitio de unión a la quimioquina

CRS2: Segundo sitio de unión a la quimioquina

DAG: Diacilglicerol

DIC: Diferencial de contraste de interferencia (del inglés: “differential interference contrast”)

DO: Densidad óptica

DOR: Receptor opioide δ (del inglés: “ δ opioid receptor”)

DMSO: Dimetilsulfóxido

EBV: Virus Epstein-Barr (del inglés: Epstein-Barr virus)

EDC: 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil) carbodiimida

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: “enzyme linked immunosorbent assay”)

ERK: Proteína quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés: “extracellular signal-regulated kinase”)

FBS: Suero fetal bovino (del inglés: “fetal bovine serum”)

FDC: Célula dendrítica folicular (del inglés: “follicular dendritic cell”)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FN: Fibronectina

FRET: Transferencia de energía resonante fluorescente (del inglés: “fluorescence resonance energy transfer”)

GABA_BR1: Receptor 1 del ácido gamma-aminobutírico B (del inglés: “gamma aminobutyric acid B receptor 1”)

GABA_BR2: Receptor 2 del ácido gamma-aminobutírico B (del inglés: “gamma aminobutyric acid B receptor 2”)

receptor 2”)

GAG: Glicosaminoglicano

GAP: Proteína activadora de GTP-asa (del inglés: GTP-ase activating protein)

GDP: Guanosina 5'-difosfato

GFP: Proteína fluorescente verde (del inglés: “green fluorescent protein”)

GPCR: Receptor acoplado a proteína G (del inglés: “G protein coupled receptor”)

GRK: Quinasa de receptores acoplados a proteínas G (del inglés: “G protein-coupled receptor kinase”)

GTP: Guanosina 5'-trifosfato

G418: Sulfato de genitcina

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanolsulfónico

HBSS: Solución salina (del inglés: “Hank’s balanced salt solution”)

H₃R: Receptor de histamina H3 (del inglés: “Histamine H3 receptor”)

IL: Interleuquina

IMF: Intensidad media de fluorescencia

IPTG: Isopropil β-D-1-tiogalacto piranósido

IP3: Inositol-1,4,5-trifosfato

LatA: Latrunculina A

LVP: Partícula lentiviral (del inglés: “lentiviral particle”)

mAb: Anticuerpo monoclonal (del inglés: “monoclonal antibody”)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés: “mitogen activated protein kinase”)

MOR: Receptor opioide μ (del inglés: “μ opioid receptor”)

MSD: Media del desplazamiento al cuadrado (del inglés: “mean square displacement”)

ND: No determinado

NHS: N-hidroxisuccinimida

PBS: Tampón salino fosfato (del inglés: “phosphate buffer saline”)

PBLs: Linfocitos de sangre periférica (del inglés: “peripheral blood lymphocytes”)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: “polymerase chain reaction”)

PEI: Polietilenimina

PFA: Paraformaldehído

PHA: Fitohemaglutinina

PIP: Fosfatidil inositol-4-fosfato

PIP2: Fosfatidil inositol-4, 5-bifosfato

PIP3: Fosfatidil inositol-3, 4, 5-trifosfato

PI3K: Fosfatidilinositol 3' quinasa

PKC: Protein quinasa C (del inglés: “protein kinase C”)

PLC: Fosfolipasa C

- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés: “phenylmethtylsulfonyl fluoride”)
- PTX:** Toxina de Pertussis (del inglés: “Pertussis toxin”)
- qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés: “quantitative polymerase chain reaction”)
- RET:** Transferencia de energía resonante (del inglés: “resonance energy transfer”)
- RFPm:** Proteína fluorescente roja monomérica (del inglés: “monomeric red fluorescent protein”)
- RGS:** Proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (del inglés: “Regulator of G protein signaling”)
- RMN:** Resonancia magnética nuclear
- rpm:** Revoluciones por minuto
- RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés: “reverse transcription polymerase chain reaction”)
- RU:** Unidades de resonancia (del inglés: “resonance units”)
- SEM:** Error estándar de la media (del inglés: “standard error of the mean”)
- SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- SLE:** Lupus eritematoso sistémico (del inglés: “systemic lupus erithematosus”)
- SRET:** Transferencia de energía resonante secuencial (del inglés: “sequential resonance energy transfer”)
- SSTR5:** Receptor 5 de la somatostatina (del inglés: “Somatostatin receptor 5”)
- TBS:** Tampón tris-salino (del inglés: “tris-buffered saline”)
- TCR:** Receptor de células T (del inglés: “T cell receptor”)
- TIRF-M:** Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (del inglés: “total internal reflection fluorescence microscopy”)
- TM:** Transmembrana
- UF:** Unidades de fluorescencia
- UL:** Unidades de luminiscencia
- V2R:** Receptor de la vasopresina 2 (del inglés: “vasopressin 2 receptor”)
- VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana
- wt:** Genotipo silvestre (del inglés: “wild type”)
- YFP:** Proteína fluorescente amarilla (del inglés: “yellow fluorescent protein”)
- 5-HT_{2B}:** Receptor de serotonina (5-hidroxitriptamina 2B)
- 7 α ,25-OHC:** 7 α ,25-dihidroxicolesterol

The image features a minimalist design with several rectangular blocks of color. A large light blue rectangle occupies the top half. Below it, a horizontal band is divided into a light blue section on the left and a medium blue section on the right. The word 'RESUMEN' is centered in the medium blue section. Below this band is another light blue horizontal strip, followed by a large medium blue rectangle at the bottom. A vertical light blue rectangle is positioned on the left side, overlapping the top and middle light blue sections.

RESUMEN

RESUMEN

Existen muchas evidencias del papel que desempeñan las quimioquinas en multitud de procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, pese a la multitud de estudios realizados en este campo, aún no se han diseñado fármacos que bloqueando la unión quimioquina-receptor tengan una aplicación clínica para el tratamiento de las patologías inflamatorias y procesos autoinmunes en los que estas proteínas están implicadas. Esta discrepancia entre esfuerzos y resultados ha obligado a los grupos investigadores a reevaluar la biología de estos mediadores inflamatorios en busca de nuevas dianas terapéuticas. En este trabajo nos hemos focalizado en las conformaciones de sus receptores.

Los receptores de quimioquinas se localizan en la superficie celular en forma de homo-, hetero-dímeros e incluso oligómeros. Son estructuras dinámicas reguladas por la coexpresión de los propios receptores y los niveles de ligando. Sin embargo, poco se sabe de cómo se regulan las conformaciones y qué fuerzas celulares las gobiernan. Aplicando técnicas de TIRF-M hemos observado que CXCR4 forma plataformas en la membrana celular, cuya unidad mínima es el dímero de acuerdo a los datos de FRET. Dichas plataformas presentan difusión sobre los lípidos de la membrana celular siguiendo un modelo conocido como “hop-difussion”. En él, los receptores están atrapados en compartimentos de membrana definidos por el citoesqueleto de actina y las proteínas que a él se asocian,

siendo capaces de “saltar” a compartimentos adyacentes donde vuelven a quedar atrapados. CXCL12, probablemente promoviendo la reorganización temporal y local de la actina, provoca la coalescencia de los receptores en plataformas de mayor tamaño, y ello facilita alcanzar el umbral de respuesta.

Otro aspecto relacionado con la dimerización de receptores que no está completamente dilucidado es la relevancia funcional de las distintas conformaciones existentes. Usando células B de ratón hemos demostrado que la formación de heterodímeros CXCR5/EBI2 reduce la afinidad de CXCR5 por su ligando CXCL13, lo cual contribuye a modular la función de ese receptor atenuando el movimiento de la célula B. Aplicando nuevos métodos de “resonance energy transfer” como SRET o BiFC, observamos también que CD4, CXCR4 y CCR5 forman complejos en la superficie celular en ausencia de ligandos cuando son coexpresados. Además mostramos que la unión de CCR5 modifica la conformación de CD4 y CXCR4. Como consecuencia, la interacción de la proteína gp120 de la envuelta de cepas X4 del VIH-1, y por lo tanto la infección por este tipo de cepas virales, se ven dificultadas.

SUMMARY

Since the first reports on chemokine function, much information has been generated on the implications of these molecules in many physiological and pathological processes. Despite extensive studies, no drugs based on the ability to block chemokine binding to their receptors have yet been approved for use in patients with inflammatory or autoimmune diseases. This discrepancy between efforts and results has prompted a re-evaluation of chemokine biology. Here, we will focus on chemokine receptor oligomerization, which is one of the earliest events in chemokine signaling.

Chemokine receptors form homo- and heterodimers, and even oligomers at the cell surface. These complexes behave as dynamic structures that are regulated by receptor coexpression and ligand levels. Little is nonetheless known on how the conformations are regulated, and what cell forces govern them. Using TIRF-M techniques we observed that CXCR4 forms platforms at the cell membrane, the smallest subunit of which is a dimer according to FRET and BRET data. These platforms diffuse on the cell membrane lipids following a model known as “hop-diffusion”. In this model, the receptor platforms are temporarily confined within a compartment defined by the actin cytoskeleton and its associated proteins, but they can hop to an adjacent compartment where they are again temporarily trapped. Binding of CXCL12, which triggers temporal and local

actin depolymerization, facilitates receptor coalescence into larger platforms, and thus facilitates to reach the response threshold.

Another issue related to receptor dimerization not yet fully understood is the functional relevance of receptor conformations. Using murine B cells, we have demonstrated that CXCR5/EBI2 heterodimers reduce the affinity of CXCR5 for its ligand CXCL13, thereby contributing to the regulation of receptor function. We detected reduced B cell movement when both receptors are coexpressed. Similarly, using new methods of resonance energy transfer such as SRET and BiFC, we furthermore observed that coexpressed CD4, CXCR4 and CCR5 form cell surface heterocomplexes even in the absence of ligands. Finally, CCR5 coexpression was shown to alter the conformation of CD4 and CXCR4. As a consequence, CCR5 coexpression impedes the interaction of the gp120 envelope protein and the cell infection of X4 HIV-1 strains.

I.-INTRODUCCIÓN

I.-INTRODUCCIÓN

1.-Quimioquinas:

1.1.-Clasificación:

Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular (6-14 kDa) originalmente descritas como citoquinas quimioatrayentes y proinflamatorias. En un principio fueron identificadas por su capacidad de atraer poblaciones leucocitarias (Baggiolini, 1998), y hoy se relacionan con multitud de procesos fisiológicos y patológicos, entre ellos regulación de la diferenciación de linfocitos T (Sallusto et al, 1998), desarrollo embrionario (Nagasawa et al, 1998; Zou et al, 1998), infección por VIH-1 (Berger et al, 1999), angiogénesis (Belperio et al, 2000), enfermedades autoinmunes (Barnes et al, 1998; Ribeiro & Horuk, 2005; Rottman et al, 2000) o cáncer (Burns et al, 2006; Muller et al, 2001).

A pesar de la variabilidad en su secuencia, las quimioquinas poseen una alta homología estructural, y de hecho se clasificaron en base a la disposición de sus cuatro residuos de cisteína altamente conservados en cuatro subfamilias:

- **CXC o α -quimioquinas** presentan un aminoácido intercalado entre las dos primeras cisteínas de su secuencia.
- **CC o β -quimioquinas** presentan las dos primeras cisteínas consecutivas.

- **CX3C o γ -quimioquina** se caracteriza por poseer tres aminoácidos entre sus dos primeras cisteínas. El CX3CL1 es el único miembro de esta subfamilia que se caracteriza por estar formado por el dominio N-terminal del receptor de neurotactina seguido por una serie de dominios de tipo mucina, una región transmembrana y una cola citoplasmática que le confiere capacidad como quimioatrayente y como molécula involucrada en adhesión celular.
- **C o δ -quimioquina** se caracteriza por poseer únicamente dos de los cuatro residuos conservados de cisteína. Esta subfamilia posee tan solo dos miembros, XCL1 y XCL2.

Inicialmente las quimioquinas adquirían su nombre en función de su papel y de las células que las producían. Sin embargo en el año 2000 se introdujo un nuevo sistema de nomenclatura basado en la identificación de la subfamilia a la que pertenecen seguido de un número, que corresponde a la posición que ocupa el gen que codifica para esa proteína en el cromosoma (Zlotnik & Yoshie, 2000). De ese modo, por ejemplo la quimioquina “stromal derived factor 1a” (SDF-1 α) pasó a llamarse CXCL12 o la proteína “monocyte chemoattractant protein 1” (MCP-1) se conoce como CCL2 ([Tabla1](#)).

Tabla 1: Receptores de quimioquinas, con referencia a las células que los expresan y a los ligandos que unen, en sus dos nomenclaturas.

Receptor	Ligando (nomenclatura actual)	Ligando (nomenclatura Clásica)	Células que expresan el receptor
CXC			
CXCR1	CXCL6, CXCL7, CXCL8	GCP2, NAP-2, IL-8	Baso, Neu
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	GRO α , GRO β , GRO γ , ENA78, GCP2, NAP-2, IL-8	Baso, Neu
CXCR3	CXCL4*, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CCL21 (mouse), CCL11	PF4, MIG, IP-10, I-TAC, BLC, SLC, Eotaxin	B, Eo, Th1
CXCR4	CXCL12	SDF-1	Baso, B, T, Neu
CXCR5	CXCL13	BLC	B, Tfh
CXCR6	CXCL16	SR-PSOX	Tmem
CXCR7	CXCL11, CXCL12	I-TAC, SDF-1	B
CC			
CCR1	CCL3, CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23, CCL26	MIP-1 α (LD78 α), LD78 β , RANTES, MCP-3, MCP-2, MCP-4, HCC-1, HCC-2, LEC, MPIF-1, Eotaxin-3	CDi, Eo, Baso
CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16, CCL11, CCL26	MCP-1, MCP-3, MCP-2, MCP-4, LEC, Eotaxin, Eotaxin-3	Mo, CDi, Baso
CCR3	CCL3L1, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL18	LD78 β , RANTES, MCP-3, Eotaxin, MCP-4, HCC-1, HCC-2, Eotaxin-2, Eotaxin-3, MEC, MIG, IP-10, I-TAC, PARC	Eo, Baso, Th2
CCR4	CCL17, CCL22	TARC, MDC	Th2, Treg
CCR5	CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5, CCL8, CCL11, CCL16	MIP-1 α , LD78 β , MIP-1 β , AT744.2, RANTES, MCP-2, Eotaxin, LEC	Th1, Baso
CCR6	CCL20	MIP-3 α	B, Th17, Treg
CCR7	CCL19, CCL21	MIP-3 β , SLC	B, T, CDm
CCR8	CCL1, CCL8	I-309, MCP-2	Th2
CCR9	CCL25	TECK	T
CCR10	CCL27, CCL28	CTACK, MEC	T
XCR			
XCR1	XCL1, XCL2	SCM-1 α , SCM-1 β	B, T, Neu
CX3CR			
CX3CR1	CX3CL1, CCL26	Fractalkine, Eotaxin-3	Mo
Atípicos			
CCRL1	CCL19, CCL21, CCL25, CXCL13	MIP-3 β , SLC, TECK, BLC	
CCRL2	CCL19, Chemerin	MIP-3 β , Chemerin	
D6	CCL2, CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22, CCL23, CCL24	MCP-1, MIP-1 α , LD78 β , MIP-1 β , AT744.2, RANTES, MCP-3, MCP-2, Eotaxin, MCP-4, HCC-1, TARC, MDC, MPIF-1, Eotaxin-2	
DARC	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL7, CXCL8, CCL2, CCL5, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17	GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, IL-8, MCP-1, RANTES, Eotaxin, MCP-4, HCC-1, TARC	

Mo: Monocitos; **CDi:** Célula dendrítica inmadura; **CDm:** Célula dendrítica madura; **B:** Célula B; **T:** Célula T; **Th1:** Célula Th1; **Th2:** Célula Th2; **Th17:** Célula Th17; **Treg:** Célula T reguladora; **Tfh:** Célula T folicular helper; **Tmem:** Célula T de memoria; **Eo:** Eosinófilos; **Baso:** Basófilos; **Neu:** Neutrófilos. Las quimioquinas marcadas en rojo representan quimioquinas con efecto antagonista sobre el receptor correspondiente. CXCL4* se une a CXCR3B, isoforma de CXCR3 implicada en angiogénesis.

Actualmente se mantiene la nomenclatura moderna, pero se prefiere una clasificación que atiende a un criterio funcional, y así, se diferencian las quimioquinas homeostáticas y las inflamatorias (Baggiolini, 1998; Moser, 2003).

Las **quimioquinas homeostáticas** son quimioquinas expresadas constitutivamente en los órganos y participan en procesos homeostáticos, es decir, en su formación y organización. Por ejemplo, CXCL13 o CCL21, dirigen la migración de los linfocitos, B o T respectivamente, hacia zonas concretas de los órganos linfoides secundarios, organizando así su arquitectura.

Las **quimioquinas inflamatorias** son quimioquinas inducibles que participan en procesos inflamatorios. Estas quimioquinas juegan un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a infecciones, daño tisular, etc. y posibilitan el reclutamiento celular específico en los tejidos inflamados.

1.2.-Estructura y oligomerización:

En las quimioquinas podemos diferenciar tres dominios estructurales: el dominio N-terminal, el central y el C-terminal. El dominio N-terminal es un dominio crítico para la señalización que está implicado junto al dominio central en la unión al receptor. Al dominio C-terminal se le ha asignado la unión a glicosaminoglicanos (GAGs), elementos críticos para entender el papel de las quimioquinas “*in vivo*” (Proudfoot et al, 2003) (**Figura 1**).

Las diferentes quimioquinas en solución adoptan un amplio rango de estados de oligomerización, formando monómeros (CCL7, CCL21), dímeros (CCL2, CXCL8, CXCL12), tetrámeros (CXCL4) y agregados oligoméricos (CCL3, CCL4 y CCL5) (Ray et al, 2012; Salanga & Handel, 2011). Existen básicamente dos tipos de estructuras diméricas: los dímeros del tipo CC que son característicos de la familia de quimioquinas CC, y los dímeros del tipo CXC que son formados predominantemente por miembros de la familia de quimioquinas CXC.

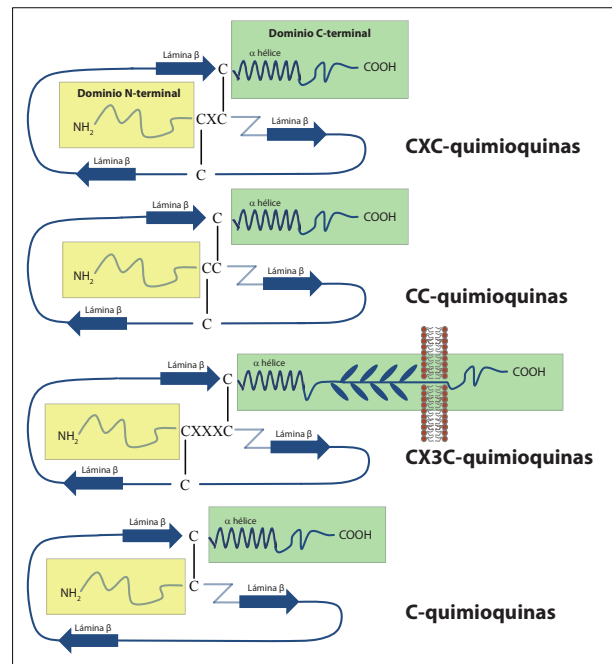


Figura 1: Esquema de la estructura de las quimioquinas. Las quimioquinas presentan una alta homología estructural, y han sido clasificadas en 4 subfamilias en función de la disposición de sus residuos de cisteína altamente conservados. En las cuatro subfamilias de quimioquinas se diferencian tres dominios estructurales, el dominio C-terminal (recuadrado en verde), el dominio N-terminal (recuadrado en amarillo) y el dominio central que une el dominio C-terminal y el N-terminal.

Estos dímeros forman la estructura básica de los agregados oligoméricos (Ren et al, 2010; Wang et al, 2011). También se han descrito heterodímeros CC/CXC como por ejemplo CCL5 y CXCL4 que promueven el reclutamiento de monocitos y su retención en el vaso sanguíneo, formando placas de ateroma (Koenen et al, 2009).

Aunque no siempre se ha relacionado con formación de heterocomplejos, existen fenómenos de sinergismo entre quimioquinas, es decir, el efecto de una quimioquina es mayor en presencia de otra quimioquina. Por ejemplo, en monocitos CXCL8 y CXCL12 ejercen un efecto sinérgico sobre CCL2 (Gouwy et al, 2008). De forma similar la presencia de CXCL13 potencia el efecto de CCL19 y de CCL21 en las células T (Paoletti et al, 2005).

Como ya hemos anticipado, en la fisiología de las quimioquinas es muy importante su interacción con los GAGs. Inicialmente se pensaba que los GAGs participaban en la oligomerización de quimioquinas (Hoogewerf et al, 1997; Lau et al, 2004), y se ha demostrado que facilitan la formación de los gradientes quimioatrayentes en la superficie celular necesarios para el posicionamiento y movimiento celular, ya que evitan el arrastre de las quimioquinas por el flujo sanguíneo o linfático (Figura 2). También se ha visto que las interacciones con GAGs facilitan la transcitosis de las quimioquinas a través de las células, y también las interacciones con el receptor (Vega et al, 2011; Wang et al, 2005; Yin et al, 2010). Se ha demostrado, usando variantes monoméricas de CXCL8 (Rajaratnam et al, 1994), CCL2 (Paavola et al, 1998), CCL4 (Laurence et al, 2000) y CCL5 (Proudfoot et al, 2003), que las qui-

mioquinas monoméricas pueden unirse al receptor manteniendo su actividad “*in vitro*”, sin embargo no son funcionales “*in vivo*” (Proudfoot et al, 2003), demostrando la importancia funcional de los complejos de quimioquinas.

2.-Receptores de quimioquinas:

2.1.-Clasificación y estructura:

Los receptores de quimioquinas pertenecen a la familia de los receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR) localizados en la membrana celular (Rossi & Zlotnik, 2000). Esta superfamilia de proteínas es una de las más abundantes en mamíferos, a ella pertenecen también los receptores de neurotransmisores, hormonas, feromonas e incluso los de fotones en la retina.

En humanos los GPCRs se dividen en 5 familias definidas por los receptores rodopsina, secretina, glutamato, adhesión y Frizzled/Taste2 (Fredriksson et al, 2003). La primera es la familia mayoritaria y se subdivide en otros 4 grupos: Receptores del grupo α (compuesto por los receptores de prostaglandina, receptores de neurotransmisores sensibles a aminas biogénicas, opsinas, melatonina y MECA), del grupo β (compuesto por 36 miembros) del grupo γ (compuesto por tres subgrupos: receptores de SOG, MCH y receptores de quimioquinas) y del grupo δ (compuesto por 4 miembros: receptores relacionados con el oncogen MAS, receptores del grupo de las glicoproteínas, receptores purinérgicos y olfatorios) (Fredriksson et al, 2003).

Los receptores de quimioquinas están formados por una única cadena polipeptídica de unos 350 aminoácidos (40 KDa) que atraviesa siete veces la membrana plasmática, quedando el extremo N-terminal y tres bucles orientados hacia el exterior celular, implicados en la unión del ligando, y el extremo C-terminal y 3 bucles intracelulares implicados en la unión de proteínas señalizadoras. La cristalización de CXCR4 ha permitido describir por primera vez, la es-

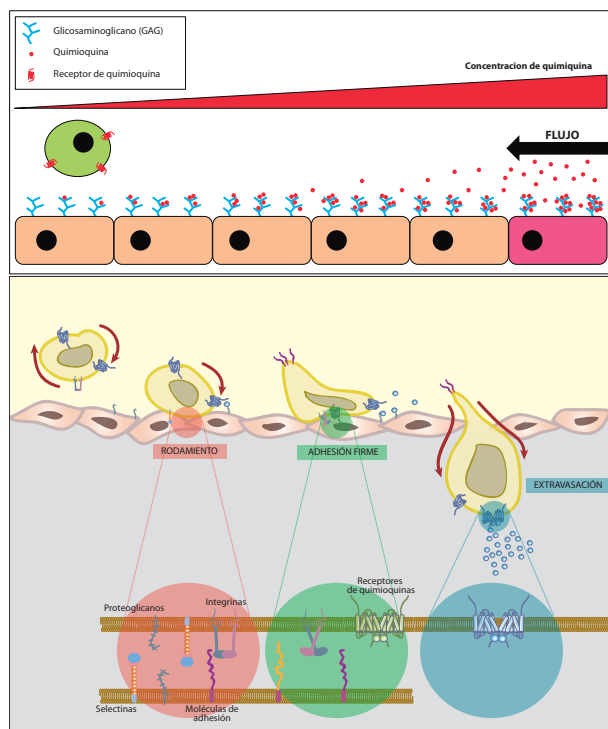


Figura 2: Modelo formación de gradiente de quimioquinas y trans migración celular. En el panel superior se muestra un modelo esquemático de la formación de gradientes de quimioquinas por los GAGs. En el panel inferior se muestra un modelo esquemático de trans migración celular en la que se destacan los procesos necesarios (rodamiento, adhesión firme y extravasación) y las moléculas implicadas en cada uno de ellos.

estructura cuaternaria de un receptor de quimioquinas con una alta resolución molecular (Wu et al, 2010) (**Figura 3**). En ella se destaca que en el segundo bucle intracelular existe un motivo (DRY) implicado en la activación de la señalización intracelular que es específico de la familia de receptores tipo rodopsina. Este motivo DRY actúa como gatillo exponiéndose la tirosina tras la unión del ligando y posibilitando la activación de la proteína $G\alpha i$ (Oldham & Hamm, 2008). Los receptores de quimioquinas presentan cuatro cisteínas altamente conservadas, las dos primeras están involucradas en la formación de un puente disulfuro entre los bucles extracelulares 1 y 2, las otras dos originan un puente disulfuro entre el extremo N-terminal

y el tercer bucle extracelular. Estos dos puentes disulfuro permiten el correcto plegamiento de la proteína, lo que determina tanto la correcta unión del ligando como el acoplamiento de las proteínas señalizadoras.

Actualmente se conocen 23 receptores de quimioquinas humanos, agrupados en 4 familias: CCR, CXCR, CX3CR y XCR, además hay un grupo de receptores atípicos (D6, DARC, CCRL1, CCRL2 y CXCR7) que carecen de dominio DRY por lo que no señalizan vía $G\alpha i$ y participan en el control de los niveles de quimioquinas en los tejidos. Son receptores “basureros” (scavenger o decoy) (Graham, 2009; Graham et al, 2012). Aunque CXCR7 fue originalmente descrito como uno de estos receptores (Kalatskaya et al, 2009; Zabel et al, 2011), recientemente se ha visto que en astrocitos y en células de glioma puede señalizar por proteína $G\alpha i$ en respuesta a CXCL12 y por β -arrestinas (proteínas citosólicas que actúan como cofactores de las quinasas acopladas a proteína G (GRKs)) mediando su desensibilización en respuesta a CXCL11 (Odemis et al, 2012). Además existen receptores codificados por virus como US28, ORF74 o M33 (Alcamí, 2003), que podrían participar en el proceso de escape del virus a la función del sistema inmune.

Aunque la mayoría de receptores de quimioquinas pueden unir varios ligandos, en algunos casos con similar afinidad (11 ligandos para CCR1 y 14 para CCR3), algunos son específicos de un solo ligando (CXCR4, CXCR5, CXCR6, CCR6, CCR8 y CCR9). Por otro lado los receptores atípicos (DARC y D6) y los receptores codificados por virus (US28) tienden a ser particularmente promiscuos con respecto al reconocimiento de ligando, confirmando su papel como controladores de los niveles de quimioquinas. De forma similar, los ligandos pueden unirse a más de un receptor formando así una compleja red de interacciones. La promiscuidad de ligandos y receptores da una idea de la redundancia que existe en el sistema inmune (Lukacs et al, 1999; Mantovani, 1999) y de su relevancia funcional. No obstante, existen razones para creer que el sistema podría no ser tan redundante como inicialmente se podía

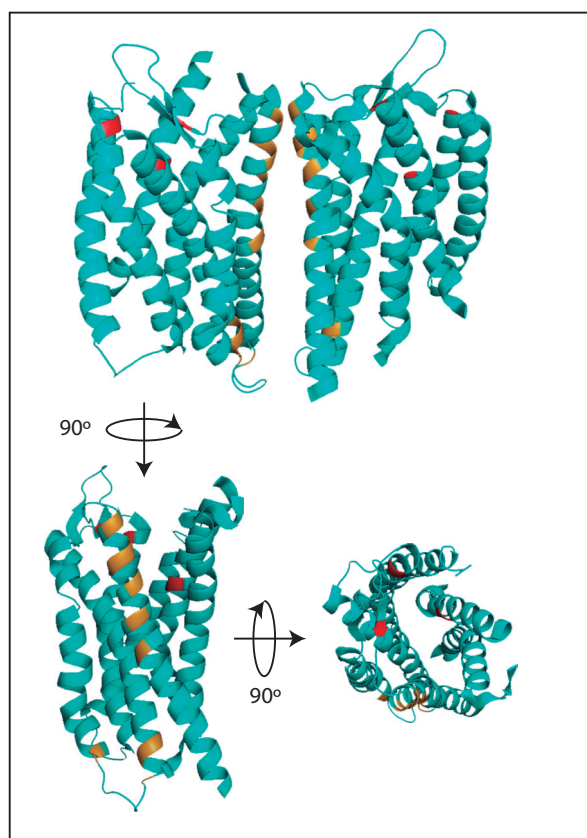


Figura 3: Estructura tridimensional del receptor de quimioquinas CXCR4. Esta estructura fue obtenida a partir de los datos del cristal de CXCR4. En la parte superior observamos la estructura del dímero de CXCR4 destacando en naranja la zona de interacción y en rojo la zona de unión del ligando. La parte inferior derecha se muestra uno de los monómeros girado 90° para poder observar en detalle la zona de interacción señalada en naranja, mientras que en la parte inferior izquierda se muestra el mismo monómero con otro giro de 90° observando la zona de unión del ligando en rojo.

pensar, sino que la variabilidad de ligandos y receptores es necesaria para conseguir una regulación máxima y fina de las funciones (Devalaraja & Richmond, 1999). Los diferentes patrones de expresión tanto espaciales como temporales de las quimioquinas y receptores, permiten un control de todas y cada una de las células del sistema inmune (Devalaraja & Richmond, 1999). La complejidad es mayor si además incluimos procesos de homo- y hetero-oligomerización de las quimioquinas y de sus receptores, y la formación de complejos con otros receptores sean GPCRs o no.

2.2.-Unión del ligando al receptor:

2.2.1.-Zonas del ligando implicadas en la unión al receptor:

El extremo N-terminal de la quimioquina es crítico para la señalización. Concretamente, se describió el papel predominante del motivo ELR del extremo N-terminal para las quimioquinas CXC (Clark-Lewis et al, 1995). Si el extremo N-terminal es mutado, suprimido o alargado, las propiedades de señalización de las quimioquinas se alteran de manera considerable sin que se vea afectada su capacidad de unión al receptor. Por ejemplo, la eliminación de siete residuos del extremo N-terminal de CCL2 hace que este ligando pase de ser un agonista a un antagonista de alta afinidad (Zhang & Rollins, 1995), el mismo efecto se observó al añadir una meteonina al extremo N-terminal tanto en CCL2 (Jarnagin et al, 1999) como en CCL5 (Proudfoot et al, 1996). La introducción de mutaciones específicas en el extremo N-terminal de CXCL12, también lo convierten en un antagonista de CXCR4 (Crump et al, 1997). Otras veces determinadas modificaciones en el extremo N-terminal originan agonistas más potentes, por ejemplo CCL14 que en condiciones fisiológicas se encuentra formando dímeros, y cuando carece de sus ocho primeros residuos disminuye su capacidad de dimerización, y ello promueve una señalización más potente “*in vitro*” (Blain et al, 2007).

Por otro lado, las mutaciones del dominio central de las quimioquinas (a partir de la

primera cisteína) modulan su afinidad por el receptor y la consecuente señalización (Blanpain et al, 2003) (**Figura 4**).

2.2.2.-Zonas del receptor implicadas en la unión del ligando:

Basándose en estudios de mutagénesis dirigida y en generación de proteínas quiméricas, hoy sabemos que el extremo N-terminal en algunos receptores (CCR2, CCR3, CCR5 y CXCR1) está involucrado en mantener la especificidad por el ligando. Por otro lado, estudios por resonancia magnética nuclear (RMN), usando péptidos derivados del extremo N-terminal del receptor y la quimioquina específica, demostraron la importancia que para la especificidad también tiene el segundo bucle extracelular de algunos receptores.

La cristalización de CXCR4 hecha en presencia de antagonistas, It1t (pequeña molécula antagonista) o CVX5 (antagonista cíclico) reveló la existencia de una amplia zona de interacción con el ligando. En el caso de It1t la unión implica las hélices transmembrana I, II, III y VII, mientras que en el caso de CVX5 son residuos de las hélices transmembrana III, IV, V, VI y VII las participantes (Wu et al, 2010). Aunque la unión de estos compuestos puede no asemejar lo que ocurre con el ligando, hay que decir que son antagonistas e interaccionan con residuos ácidos como los implicados en la unión del extremo N-terminal de CXCL12 (Wu et al, 2010). En conjunto estos datos sugieren que tanto CXCL12 como los antagonistas usados se están uniendo al denominado dominio CRS2 (segundo sitio de unión de la quimioquina) del receptor, formado por las hélices transmembrana y el segundo bucle extracelular (ECL2).

Finalmente cabe reseñar que “*in vivo*” los receptores de quimioquinas y sus ligandos son dianas de procesos de glicosilación y/o sulfatación sobre residuos de tirosina en la región N-terminal (Bannert et al, 2001; Farzan et al, 2002; Farzan et al, 1999; Farzan et al, 2000; Fong et al, 2002; Preobrazhensky et al, 2000), y dianas de tirosin sulfotransferasas, que pueden modificar las características de unión y afinidad.

2.2.3.-Modelo de unión quimioquina/receptor:

Existen evidencias (Kofuku et al, 2009) que apoyan al modelo establecido de dos sitios de unión de la quimioquina al receptor necesarios para la completa activación. El dominio central de la quimioquina se une al extremo N-terminal del receptor (primer sitio de unión de la quimioquina o CRS1) orientando el extremo N-terminal de la quimioquina hacia las regiones transmembrana del receptor (CRS2). En esas condiciones las quimioquinas provocan el cambio conformacional del receptor necesario para activar la señalización intracelular (Blanpain et al, 2003; Kofuku et al, 2009) (**Figura 4**).

Según estos estudios, y asumiendo que el receptor se encontrase en forma monomérica, se interpretó que la forma relevante de interacción quimioquina:receptor correspondía con una estequiometría 1:1. Sin embargo, existen muchas evidencias que demuestran que los receptores de quimioquinas existen como homo- y hetero-oligómeros, lo que conduce a una alternativa diferente tanto en la estequio-

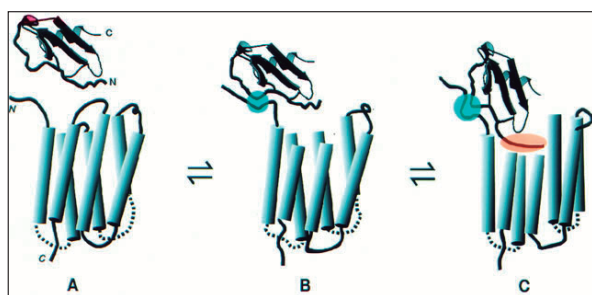


Figura 4: Esquema del modelo de “dos sitios de unión” ligando-receptor. El dominio central de la quimioquina se une al extremo N-terminal del receptor en el primer sitio de unión, también llamado CRS1 (representado con círculo azul). Esto promueve una reorientación del extremo N-terminal de la quimioquina que interacciona con regiones transmembrana del receptor en el segundo sitio de unión, también llamado CRS2 (representado con círculo naranja), promoviendo el cambio conformacional del receptor necesario para desencadenar la señalización. Imagen tomada de *Crump et al. 1997*.

metría como en el modo de unión de la quimioquina a los oligómeros de receptores. Tomando como modelo de receptores de quimioquinas el cristal de CXCR4 y teniendo en cuenta el tipo de estructuras y cargas de la molécula, podrían existir estequiometrías 1:1, 1:2 ó incluso 2:2.

3.-Oligomerización de GPCRs:

3.1.-Evidencias de homo y hetero-oligomerización:

Aunque clásicamente, la actividad de los GPCRs se había ligado a una conformación monomérica (Bayburt et al, 2011; Ernst et al, 2007; Kuszak et al, 2009), múltiples evidencias hoy demuestran que los GPCRs pueden dimerizar e incluso oligomerizar (Hamatake et al, 2009; Hernanz-Falcon et al, 2004; Percherancier et al, 2005; Wang et al, 2006; Wilson et al, 2005).

La dimerización de estos receptores se produce durante su síntesis en el retículo endoplásmico y es necesaria para el transporte de los nuevos receptores formados a la membrana celular (Salahpour et al, 2004). En algunos casos, como el del receptor $\beta 2$ adrenérgico, la dimerización es necesaria para que los receptores puedan expresarse en la membrana celular (Bulenger et al, 2005; Limatola et al, 2003; Milligan, 2004; Prinster et al, 2005; Terrillon & Bouvier, 2004). También se ha relacionado la dimerización con procesos de desensibilización de los receptores mediados por arrestinas, pero al igual que para la proteína G, sólo es necesaria la interacción de uno de los miembros del dímero con una molécula de arrestina (Hanson et al, 2007). En los GPCRs que establemente forman dímeros, se ha demostrado que para la unión de la proteína G al receptor, es suficiente con la activación de uno de los miembros de la pareja, lo que apoya que la estequiometría de la unión GPCR:proteína G sea 1:1 (Gurevich & Gurevich, 2008).

De hecho existen varios modelos de dimerización basados en las regiones del receptor implicadas en la dimerización. Un primer

grupo engloba a receptores cuyo dominio de dimerización se localiza preferentemente en su extremo N-terminal, este es el caso de algunos canales iónicos o del receptor de glutamato. Un segundo grupo, incluye receptores que dimerizan preferentemente por su región C-terminal, como es el caso de los receptores I y II del ácido γ -aminobutírico (GABA_B-R1 y GABA_B-R2). Finalmente hay receptores que dimerizan utilizando las regiones transmembrana, como ocurre con el receptor D2 dopaminérgico o con el β -adrenérgico (Bulenger et al, 2005).

En el caso de los receptores de quimioquinas, los primeros dímeros se pusieron de manifiesto usando técnicas de inmunoprecipitación y western blot. CCR2, CCR5 y CXCR4 forman dímeros, y la mutación del dominio DRY en el CCR2 genera un receptor no funcional que además actúa como dominante negativo del CCR2 natural (Mellado et al, 1999). Estudios posteriores empleando técnicas de transferencia de energía por resonancia (BRET y FRET), demostraron que los dímeros preexisten en la superficie celular en ausencia de ligando. Así se demostró primero para CCR2 y CCR5 (Benkirane et al, 1997; El-Asmar et al, 2005; Hernanz-Falcon et al, 2004; Issafras et al, 2002; Percherancier et al, 2005), pero luego también para CXCR4, CXCR1 y CXCR2 (Martínez Muñoz et al, 2009; Wilson et al, 2005).

La dimerización también parece ocurrir durante la síntesis de proteínas y es independiente de la acción del ligando, así se ha visto para CXCR2 (Trettel et al, 2003) o para CCR5 (Issafras et al, 2002). Precisamente ese hecho explica cómo el mutante natural CCR5 Δ 32 dimeriza con CCR5 y lo retiene intracelularmente (Benkirane et al, 1997). En consecuencia se produce una reducción de CCR5 en la superficie celular que explicaría por qué los individuos heterocigotos para CCR5 Δ 32 presentan retraso en el desarrollo del SIDA (Benkirane et al, 1997). De todos modos la mutación CCR5 Δ 32 también se ha relacionado con una reducción de las copias del gen CCR5, reduciendo la expresión de éste en la membrana celular, y por tanto explicando también la menor infección del VIH-1 observada (Paxton et al, 1998; Venkatesan et al, 2002).

Los receptores de quimioquinas pertenecen a los GPCR que utilizan regiones transmembrana para dimerizar, por ejemplo en CCR5 se describieron los residuos Ile52 y Val150 de las regiones TMI y TMIV respectivamente, como claves para la dimerización. De hecho mutaciones puntuales en esos residuos conducen a la ausencia de dimerización y función asociada (de Juan et al, 2005; Hernanz-Falcon et al, 2004). Para CXCR2 se ha descrito que participan en la dimerización el primer bucle extracelular, la región TMIII y el segundo bucle intracelular (Trettel et al, 2003). Péptidos cíclicos con una estructura del TMI inhiben la función de CCR2 (Hurevich et al, 2013).

La reciente cristalización de CXCR4, ha confirmado estructuralmente la formación de dímeros de CXCR4 ya demostrados por RET. En el cristal de CXCR4, se resolvieron cinco estructuras diferentes, con la característica común de que en todas ellas se mostraba al dímero como unidad estructural, presentando principalmente interacciones entre las hélices transmembrana V y VI (Wu et al, 2010). La estructura dimérica observada en el cristal se ve reforzada, ya que las cinco estructuras presentan la misma zona de contacto, descartando que este fenómeno se deba a una consecuencia artefactual del cristal. Debe no obstante, indicarse que los cristales de CXCR4 se han conseguido en presencia de antagonistas asociados al receptor, por lo que no puede descartarse un efecto activo de los ligandos en la dimerización y por tanto sobre los residuos implicados.

El estudio del proceso de heterodimerización de GPCRs también ha crecido exponencialmente. La primera evidencia de una relevancia funcional asociada a los heterodímeros se obtuvo con el receptor de GABA, GABA_B-R1 y GABA_B-R2, ya que la heterodimerización de estos dos receptores era necesaria, tanto para alcanzar la membrana plasmática, como para que fuesen funcionalmente activos. (Margeta-Mitrovic et al, 2000; Marshall et al, 1999; Kuner et al, 1999). Mutantes de receptores de vasopresin V2R (Zhu & Wess, 1998), D3 dopamina (Grosse et al, 1997), CCR5 (Benkirane et al, 1997), CCR2 (Colley et al, 1995; Rodríguez-Frade et al, 1999), y rodopsina (Co-

lley et al, 1995) tienen un efecto de dominancia negativa sobre sus receptores naturales. En muchos de estos casos, se ha comprobado que la forma natural y la mutante son capaces de heterodimerizar, quedándose retenidas en el retículo endoplásmico.

El fenómeno de la heterodimerización de los GPCRs se ha relacionado con la diversidad farmacológica de los receptores involucrados. Los primeros estudios realizados con la pareja de receptores opioides δ y κ , demostraron la existencia de cooperatividad positiva entre ellos (Jordan & Devi, 1999). Igual sucede con GABA_B-R1/GABA_B-R2 (Galvez et al, 2001), receptores opioides δ/μ (Gomes et al, 2000), receptores muscarínicos M2/M3 (Maggio et al, 1999), receptores de somatostatina SSTR5/dopamina D2 (Rocheville et al, 2000) y de adenosina A2A/dopamina D1 (Franco et al, 2000).

En los receptores de quimioquinas, también hay ejemplos de relevancia funcional asociados a la heterodimerización. Por ejemplo, “*in vitro*” el complejo CCR2/CCR5 activa una señalización específica diferente a la generada por los homodímeros CCR2 y CCR5 (Mellado et al, 2002; Mellado et al, 2001). Por otro lado, también se ha demostrado la señalización en trans del complejo CCR2/CXCR4; en células que coexpresan ambos receptores, la unión de un antagonista de CXCR4 (AMD3100) o un agonista inverso de CCR2 (TAK779) inhibe la unión del ligando del otro receptor (Sohy et al, 2007). De esta manera, la estabilización de una conformación podría desencadenar mecanismos de señalización diferentes a la respuesta del receptor individual.

Se sabe que CXCL12 se une tanto a CXCR4 como a CXCR7, sin embargo CXCR7 no es capaz de asociar proteína G (Naumann et al, 2010). Estos receptores forman heterodímeros CXCR4/CXCR7, de esta manera CXCR7 actúa modulando la respuesta de CXCR4 a CXCL12 (Levoye et al, 2009; Sierro et al, 2007). También se ha descrito cómo los heterodímeros CXCR4/CXCR7 intensifican la señalización promovida por CXCL12 durante el desarrollo embrionario (Sierro et al, 2007). Por

otro lado, se ha observado que el bloqueo de CXCR7 regula la activación de integrinas mediada por CXCR4 en linfocitos y en células hematopoyéticas CD34⁺ (Hartmann et al, 2008). Por tanto los heterodímeros CXCR4/CXCR7 podrían ser considerados una unidad funcional independiente que contribuye a la plasticidad del CXCL12.

Homo y heterodímeros no son estructuras fijas, realmente proporcionan un mecanismo dinámico de funcionalidad. Hoy sabemos que homo y heterodímeros pueden intercambiarse en función de la expresión de los receptores y los niveles de ligando (Martínez Muñoz et al, 2009).

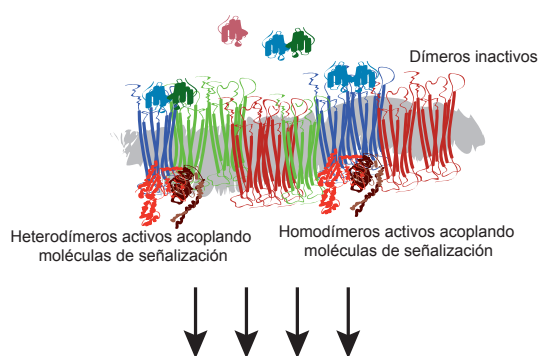
3.2.-Efectos de la hetero-oligomerización sobre la unión del ligando:

Los complejos homo- y heterodiméricos existen en ausencia de ligandos, pero estos contribuyen a la estabilización de los complejos. CCR2 y CCR5 interaccionan en ausencia de agonistas (El-Asmar et al, 2005) y la unión de sus respectivos ligandos no tuvo efecto en los valores de BRET₅₀ (relacionado con la afinidad aparente) pero sí en el BRET_{max} (relacionado con el número de complejos). Un efecto similar se observó en el caso de los complejos CCR2/CXCR4 (Percherancier et al, 2005).

En ensayos de unión de ligando marcado radioactivamente con ¹²⁵I, se observó en células que expresaban solo CCR2, que la unión del CCL2 no se veía afectada por la presencia de ligandos de CCR5. De forma similar, en células que sólo expresaban CCR5, se vió que la unión de CCL4 no se veía afectada por la presencia de los ligandos de CCR2. Sin embargo, en células que coexpresaban CCR2 y CCR5, se observó que la exposición de ambos ligandos provoca que cada ligando reduzca la unión del otro ligando a su receptor, de esta forma los ligandos de CCR5 inhiben la unión de CCL2 a CCR2, y *viceversa*. Este fenómeno de transinhibición sugiere un papel de los heterodímeros modulando la respuesta de otras quimioquinas (Springael et al, 2006). La transinhibición de la unión del ligando fue también demostrada para

los hetero-oligómeros CCR2/CXCR4 (Sohy et al, 2007) y para los complejos de CCR2/CCR5/CXCR4 (Sohy et al, 2009) (**Figura 5**).

También se ha descrito el efecto de la transinhibición como una consecuencia del secuestro de proteína G por parte del otro receptor, y esto podría ser independiente a la formación de los heterodímeros (Birdsall, 2010; Chabre et al, 2009; Vischer et al, 2011). En el caso de la unión de CCL4 a CCR5, se ha visto que tanto la adición de PTX como de compuestos análogos al GTP producen una fuerte reducción de la unión del ligando al receptor (Springael et al, 2006). En este sentido, el secuestro de la proteína G debido a la unión de un agonista a su receptor puede producir una disminución de la afinidad del otro receptor por su ligando, sobre todo si la proteína G está presente en cantidades limitantes.



Consecuencias funcionales

1. Regulación del tráfico del receptor
2. Modulación alostérica
3. Modulación de la afinidad por el ligando
4. Activación de distintas vías de señalización
5. Modulación de la función del ligando

Figura 5: Relevancia funcional de la oligomerización de receptores de quimioquinas. Se ha demostrado que heterodimerización de los receptores de quimioquinas puede tener consecuencias en el del tráfico del receptor, modulación de la unión del ligando, efecto alostérico, activación de diferentes rutas de señalización y/o la modulación del comportamiento de los otros receptores del complejo.

3.3.-Efectos de la hetero-oligomerización sobre la señalización:

Algunos estudios han apuntado que los heterodímeros median sinergismo entre quimioquinas (Mellado et al, 2001), aunque este efecto no parece ocurrir en todos los casos (Sohy et al, 2007; Sohy et al, 2009). El uso de antagonistas específicos de un receptor ha demostrado efectos sobre otros receptores presentes en los complejos. El AMD3100, que es un antagonista de CXCR4, inhibe tanto la señalización de CXCR4 en respuesta a CXCL12, como la señalización de CCR2 en respuesta a CCL2. El mismo efecto se observó con TAK-799 (agonista inverso de CCR2), que es capaz de bloquear la señalización tanto de CCL2 como de CXCL12 en células que coexpresan ambos receptores (CCR2 y CXCR4) (Sohy et al, 2007; Sohy et al, 2009). En esta línea, estudios posteriores demostraron interacciones cooperativas y hetero-oligomerización entre CCR2, CCR5 y CXCR4, a la vez que inhibición en la movilización de calcio y migración en respuesta a sus ligandos, cuando están presentes antagonistas de los receptores que no son estimulados. Esta competición cruzada también está presente “*in vivo*”, donde el TAK-799 (que antagoniza a CCR5 y a CCR2) bloquea la migración de las células promovida por CXCL12 (Sohy et al, 2009). Estos datos apuntan a que basándose en procesos de oligomerización de receptores es posible inhibir la actividad de un receptor de quimioquinas actuando sobre otro receptor.

En algunos casos la heterodimerización, se ha ligado a diferencias en la señalización. Así, CCR2 y CCR5 activan una proteína $G\alpha i$ cuando son activados por sus ligandos específicos, pero cuando son coexpresados en la misma célula y activados simultáneamente se asocian a una proteína $G\alpha q$, en consecuencia la respuesta no es sensible al tratamiento con toxina de Pertussis y la célula se adhiere en lugar de migrar (Mellado et al, 2001). Algo similar se ha observado durante la formación de la sinapsis inmunológica, CXCR4 y CCR5 son reclutados a esa zona y activando a la proteína $G\alpha q$ contribuyen a la estabilización de la unión de la célula T a la APC (célula presentadora de antígeno) (Molon et al, 2005).

3.4-Heterodimerización de receptores de quimioquinas con otros GPCRs:

Entre los receptores de quimioquinas se han descrito también heterodímeros con otros GPCRs como receptores opioides y receptores codificados por virus.

CCR5 heterodimeriza con los receptores opioides μ , δ y κ (Suzuki et al, 2002), lo que se refleja en procesos de desensibilización cruzada como en el caso de la heterodimerización de CCR5 con MOR (Chen et al, 2004). Heterodímeros de CXCR4 y DOR se han asociado con procesos de modulación de la señalización individual (Pello et al, 2008).

La dimerización de receptores de quimioquinas con GPCRs codificados por virus se ha relacionado con el bloqueo de la función de la quimioquina (Nijmeijer et al, 2010). Así BILF1 (GPCR codificado por el virus Epstein-Barr) es capaz de heterodimerizar con un gran número de receptores de quimioquinas (CCR6, CCR7, CR9, CCR10, CXCR3, CXCR4, CXCR5 y CXCR7) (Vischer et al, 2008).

4.-Activación del receptor:

4.1.-Principales proteínas implicadas en la señalización:

4.1.1.-Proteína G:

Los receptores de quimioquinas están acoplados a proteínas G. Son proteínas heterotriméricas que se caracterizan por su capacidad de unir nucleótidos de guanina (GDP o GTP). Están formadas por tres subunidades procedentes de 3 familias (α , β y γ): 21 subunidades de $G\alpha$ son codificadas por 16 genes, 6 subunidades de $G\beta$ codificadas por 5 genes y 12 subunidades de $G\gamma$ (McCudden et al, 2005; Oldham & Hamm, 2008). Existen distintos tipos de proteína G dependiendo del tipo de subunidad α que presentan y de la función que realizan (Hepler & Gilman, 1992). Entre otras:

- G α i**: inhibe la adenilato ciclasa.
- G α s**: activa la adenilato ciclasa.
- G α q**: actúa sobre la fosfolipasa C.
- G α ₁₂**: activa Rho.

Las tres subunidades se encuentran formando un complejo estable en el que la subunidad $G\alpha$ se encuentra unida a GDP (Svoboda et al, 2004). La unión del ligando promueve un cambio conformacional del receptor que permite la unión del complejo proteico. Esto provoca un desplazamiento del GDP por GTP produciendo la disociación de $G\alpha$. Mientras $G\beta\gamma$ se mantiene unido a la membrana la subunidad $G\alpha$ permanece unida al receptor, iniciando la cascada de señalización (**Figura 6**).

La subunidad α posee actividad GTP-ásica, por lo que es capaz de hidrolizar la molécula de GTP, quedando entonces una molécula de GDP unida, lo que devuelve a la proteína G a su estado inactivo. La subunidad $G\alpha$ -GDP presenta una alta afinidad por el complejo $G\beta\gamma$, por lo que se disocia del receptor dejando la proteína G lista para otro ciclo de activación/desactivación. Todo este proceso está regulado por proteínas como las RGS (Regulator of G protein Signaling), que regulan la actividad de las proteínas G asociándose a la $G\alpha$ -GTP y otras que actúan como GAPs (GTP-asa Activating Protein), que aceleran la hidrólisis de las moléculas de GTP asociadas a la proteína G limitando la señalización.

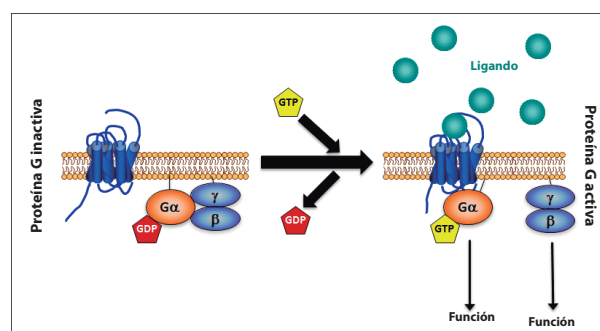


Figura 6: Activación de la proteína G. La unión de la quimioquina al receptor permite la unión de la subunidad α de la proteína G al receptor, la cual cambia el GDP, que tenía unido por GTP, produciéndose entonces la activación de la proteína G.

Las proteínas G son sensibles a la acción de varias toxinas bacterianas, la toxina colérica por ejemplo bloquea la proteína $G_{\alpha s}$, mientras que la toxina de Pertussis bloquea $G_{\alpha i}$.

Las proteínas G participan en rutas de señalización muy variadas, que incluyen la fosfolipasa C (PLC), la quinasa que fosforila en 3' al fosfatidilinositol (PI3K), o las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), entre otras.

4.1.2.-Fosfolipasa C (PLC):

En este epígrafe se agrupa una familia de enzimas que hidrolizan el PIP2 (fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato) presente en la membrana plasmática promoviendo la formación de IP3 (inositol-1,4,5-trifosfato) y DAG (diacilglicerol). El IP3 formado difunde por el citoplasma celular hasta alcanzar el retículo endoplásmico, donde tras unirse a un receptor específico moviliza las reservas de calcio intracelular. Mientras tanto el DAG interacciona con la PKC (Protein Kinase C) activándola (activación dependiente de calcio) y promoviendo la fosforilación del receptor y su posterior desensibilización.

4.1.3.-Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K):

Actúan sobre fosfoinosítidos presentes en la membrana celular añadiendo un grupo fosfato en la posición 3' del anillo inositol. Sus sustratos (PI, PIP y PIP2) están presentes en la célula en muy bajos niveles, y tras su activación, la aparición en la membrana celular de sus productos (PIP, PIP2 y PIP3) provoca el reclutamiento de proteínas con dominios PH implicadas en la polarización y movimiento celular. PI3K media la activación de AKT, que es realmente su proteína efectora, y presenta actividad serín/treonín quinasa.

En función del sustrato que unen y el mecanismo de regulación que presentan hay tres clases de PI3K. Todas ellas presentan una subunidad con un dominio catalítico PIK (p110) con actividad quinasa y otro con actividad reguladora (p85 en la clase IA).

Clásicamente se ha demostrado que las quimioquinas activan la PI3K clase IA. Concretamente, la PI3K γ está asociada a los receptores de la familia GPCRs, ya que es activada por complejos $G\beta\gamma$. Así, esta quinasa está implicada directamente en la migración de determinados tipos celulares y en la activación de las ERK ("Extracellular Signal-Regulated Kinase").

4.1.4.-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase):

Pueden ser activadas por quimioquinas, y están involucradas en la activación de proteínas del citoesqueleto y en la expresión génica. Su activación se asocia a proliferación, diferenciación, migración y apoptosis.

4.1.5.-GRKs:

Otro mecanismo de regulación de la activación de la proteína G es mediado por serín-treonín quinasas (GRKs). Estas proteínas fosforilan al receptor activo en residuos de serina y treonina, creando sitios de unión de las arrestinas, inhibiendo la señalización del receptor promovida por la proteína G y promoviendo la internalización del receptor en vesículas de clatrina. Una vez que el receptor ha sido internalizado, puede o bien reciclarse volviendo a la membrana celular o ser degradado en el proteosoma.

La respuesta de las células a las quimioquinas es transitoria y los receptores son rápidamente desensibilizados, es decir dejan de responder a un segundo estímulo. La estimulación continuada de la célula da lugar a una **desensibilización homóloga** de los receptores y la consiguiente internalización, estos procesos se encuentran mediados por las GRKs. Los receptores de quimioquinas también sufren fenómenos de **desensibilización heteróloga**, en la que la activación de un receptor por una quimioquina bloquea la posterior activación de otro receptor diferente.

5.-Procesos fisio-patológicos en los que participan las quimioquinas y sus receptores:

La red de quimioquinas y receptores, su promiscuidad, los procesos de desensibilización y el hecho de que una célula exprese incluso simultáneamente a lo largo de su vida más de un receptor, explican cómo estos mediadores tienen un papel muy importante y son responsables de que las células ocupen una posición correcta en tiempo y lugar preciso, e implica a estas moléculas en multitud de procesos fisiológicos, como desarrollo del sistema inmune, desarrollo embrionario, regulación del sistema neuroendocrino; y patológicos, como por ejemplo, infección por virus, enfermedades autoinmunes o desarrollo de tumores.

5.1.-Desarrollo del sistema inmune:

En el sistema inmune distinguimos el sistema inmune innato y adaptativo. El **sistema inmune innato**, formado principalmente por macrófagos y neutrófilos, posibilita una respuesta inmediata contra los patógenos, que sin embargo es inespecífica y no genera memoria inmunológica. El **sistema inmune adaptativo**, que se encuentra formado por los linfocitos, proporciona una defensa contra las infecciones más lenta, especializada y compleja, y que además genera memoria.

La respuesta adaptativa, requiere la presentación de los antígenos, aspecto que realizan las células presentadoras de antígenos (APCs). Dentro de las APCs, las células dendríticas son las más especializadas en esa función, aunque también macrófagos y células B pueden hacerlo. Las células dendríticas derivan de precursores de médula ósea, y posteriormente se distribuyen por los diferentes tejidos para ejercer su labor de patrullaje en búsqueda de patógenos. Cuando una célula dendrítica capta un antígeno, se activa y migra vía linfa a un ganglio linfático cercano. Tras esta activación la célula dendrítica se convierte en una célula presentadora de antígeno (APC), que será reconocida por una célula T con un TCR específico del antígeno en cuestión.

Los linfocitos B también se forman en médula ósea a partir de precursores hematopoyéticos, y posteriormente migran hacia los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y mucosas) en busca de antígeno. Su activación produce su expansión y selección clonal, dando lugar a células B de memoria y a las efectoras o plasmablastos.

5.1.1.-Órganos linfoides y migración :

Los precursores de células T originados también en la médula ósea, migran al timo donde completan su diferenciación y originan células T CD4⁺ o CD8⁺ que después vía linfa y sangre también pueblan los órganos linfoides secundarios, para así posibilitar los reconocimientos antígenicos. Las quimioquinas resultan críticas en todos estos movimientos celulares. De hecho, la llegada de las células T a ganglios linfáticos depende de CCL21, CCL19 y de su receptor CCR7. Los ratones CCR7^{-/-} y los *plt/plt*, que carecen de CCL19 y CCL21 tienen grandes defectos en la estructura de los ganglios linfáticos. Además los órganos linfoides secundarios se encuentran estructural y funcionalmente compartimentalizados, un proceso que también es mediado por quimioquinas y que posibilita la existencia de nichos que mantienen la supervivencia, activación y diferenciación de las células que los forman. En los órganos linfoides secundarios se separan las células B y T para formar de esta manera zonas bien diferenciadas, la zona T y la zona B o folículo linfoide. En el bazo, la zona B está rodeada de la zona marginal, en la que se encuentran macrófagos y una población de células B denominadas células B de la zona marginal. Dentro de los ganglios también hay células dendríticas que se localizan principalmente en la zona T, aunque también están presentes en zonas interfoliculares y en los “bridging channels”, que conectan las zona T con la pulpa roja.

Las quimioquinas son responsables de esa compartimentalización:

-CXCL13: Es producida, principalmente en el folículo, por células dendríticas foliculares y estromales (FDCs) y hace que las células B se segreguen en los folículos y se orga-

nicen (Cyster et al, 2000; Katakai et al, 2008; Mueller & Germain, 2009).

-CCL19/CCL21: Son producidas, principalmente en la zona T, por las células fibroblásticas reticulares. Participan en la atracción de las células T, B y dendríticas al ganglio y en la segregación de las células T (Cyster, 2005).

-CXCL12: Es producida en la zona oscura ("Dark zone") del centro germinal, la pulpa roja del bazo y en los cordones medulares del nódulo linfático. Su presencia se ha asociado por algunos autores a facilitar la entrada de alguna subpoblación T en el ganglio (Scimone et al, 2004) y a la salida de las células B plasmacitoides.

Además, las quimioquinas gobiernan el movimiento de las células en los órganos linfoides secundarios, lo que posibilita el reconocimiento antigénico, los procesos de activación celular y el desarrollo de la propia respuesta inmune.

El movimiento de los linfocitos B en búsqueda de antígenos en los folículos linfoides, es dependiente de CXCR5 en respuesta a CXCL13 vía Gαi (Forster et al, 1996; Gunn et al, 1998; Gunn et al, 1998). Una vez que la célula B captura un antígeno vía el receptor de células B (BCR), se produce su activación, promoviendo un aumento de los niveles de CCR7 mientras mantiene constantes los de CXCR5 (Pereira et al, 2009; Reif et al, 2002). En consecuencia, las células B responden al gradiente de CCL19/CCL21 y se dirigen al borde B-T, donde contactan con los linfocitos T helper (Reif et al, 2002). Ese contacto produce una activación de los linfocitos B vía CD40, teniendo entonces dos vías alternativas de diferenciación:

-La vía de los plasmablastos: En esta vía las células B migran a zonas extrafoliculares siguiendo gradientes de CXCL12, y allí originarán plasmablastos que darán lugar a las células plasmáticas (células B con alta capacidad secretora de inmunoglobulinas) de la respuesta temprana de anticuerpos.

-La vía de células B del centro germinal: En esta vía las células B activadas regresan a la zona B, por un aumento de la quimiotaxis a CXCL13. Se diferenciarán entonces a células B del centro germinal, madurarán, harán el conocido como "class switching", y finalmente acabarán formando células B de memoria y plasmablastos que se diferenciarán a células plasmáticas encargadas de generar la respuesta específica de antígeno.

5.1.2.-EBI2 :

El receptor EBI2 fue descrito por primera vez como el gen de la molécula 2 inducida por la infección del virus Epstein-Barr en células de linfoma de Burkitt, un linfoma de células B (Birkenbach et al, 1993). Se trata de un GPCR de la subfamilia de receptores de tipo rodopsina que posee siete dominios transmembrana (Rosenkilde et al, 2006).

Aunque inicialmente EBI2 fue considerado como un receptor huérfano, estudios recientes han demostrado que EBI2 es activado por 7α,25-dihidroxicolesterol, un derivado del colesterol (Hannedouche et al, 2011; Liu et al, 2011). La conversión del colesterol en 7α,25-dihidroxicolesterol depende de dos enzimas, CH25H y CYP7B1 (Russell, 2003), que son expresadas en células estromales linfoides (Hannedouche et al, 2011), y por lo tanto presentes en los ganglios linfáticos.

De hecho EBI2 se expresa constitutivamente no sólo en linfocitos B, sino también en linfocitos T y células dendríticas (Hannedouche et al, 2011; Liu et al, 2011; Pereira et al, 2009), aunque sus niveles aumentan tras la activación en células B (Gatto et al, 2009; Kelly et al, 2011; Pereira et al, 2009).

EBI2 tiene un papel clave en la migración de los linfocitos B en los folículos linfoides y en el bazo, así como en el posicionamiento de estas células en estos órganos linfoides (Gatto et al, 2011; Kelly et al, 2011). Los linfocitos B de ratones deficientes en EBI2 muestran unos patrones anormales de migración, las células B no se retienen en el borde T ni se originan correctamente células plasmáticas, lo que lle-

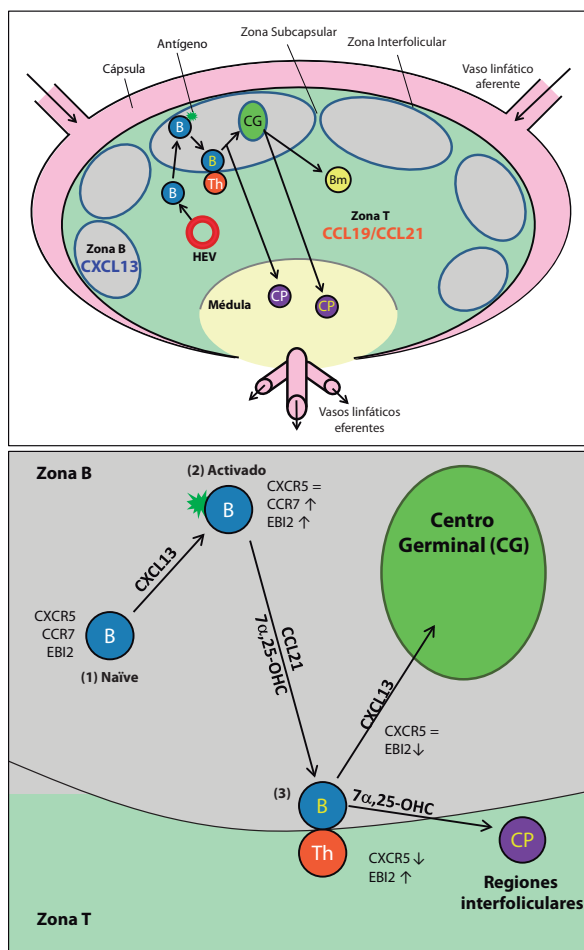


Figura 7: Estructura de un ganglio linfático y esquema de las primeras etapas de la migración de los linfocitos B tras su activación. (1) El linfocito B naïve migra en busca de antígeno en respuesta a CXCL13. (2) Tras su activación se produce un aumento de los niveles de CCR7 y EBI2 mientras que CXCR5 se mantiene constante y empieza a migrar hacia el borde B-T. (3) En el borde B-T se produce el contacto con la célula T, y los linfocitos B tienen entonces dos vías diferentes de diferenciación: la de los plasmablastos y la del centro germinal. HEV: venas de endotelio alto, Bm: célula B de memoria, CP: célula plasmática.

va a graves defectos en la generación de respuestas humorales (Gatto et al, 2009; Pereira et al, 2009), sugiriendo que EBI2 colabora con CXCR5 y CCR7 para la apropiada localización de los linfocitos B (Gatto et al, 2011; Kelly et al, 2011), lo que resulta crítico para la localización y generación de plasmablastos (Figura 7).

5.1.3.-Implicaciones funcionales:

Alteraciones en la expresión de EBI2 se han relacionado con patologías autoinmunes e inflamatorias:

***En diabetes tipo 1:** Se ha detectado su expresión en macrófagos localizados en distintos tejidos (páncreas, hígado, riñón y corazón), y por otro lado reducción en sus niveles de expresión se ha asociado con el aumento de la expresión de ciertos genes implicados en la enfermedad como por ejemplo el factor regulador 7 de interferón (Heinig et al, 2010).

***Lupus eritematoso sistémico (SLE):** Se ha descrito una disminución de los niveles de EBI2 en células de sangre periférica de pacientes de SLE (Ye et al, 2003).

***Enfermedades neoplásicas:** En la leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica y en el linfoma difuso de células B se han descrito variaciones de niveles de expresión de EBI2 (Aalto et al, 2001; Alizadeh et al, 2000; Ley et al, 2008; Shipp et al, 2002). En el caso del linfoma difuso de células B se reduce la expresión de EBI2 tanto en las células B foliculares como en las células B del centro germinal.

***Infección del virus Epstein-Barr (EBV):** La infección del virus Epstein-Barr promueve un aumento de los niveles de EBI2 en las células B infectadas (Birkenbach et al, 1993), lo que hace que se localicen en zonas interfoliares evitando su posicionamiento en los centros germinales (Kurth et al, 2000). Esta característica puede ser utilizada por el virus Epstein-Barr como un mecanismo de evasión del sistema inmune.

5.2.-Infección por virus:

5.2.1.-Clasificación y estructura del VIH :

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus ARN perteneciente a la familia *Retroviridae* perteneciente, género *Lentivirus*. Se han descrito dos tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el más extendido y es de hecho el responsable de la mayoría de las infecciones por VIH en el mundo, mientras que el VIH-2 parece ser menos patógeno y menos transmisible.

El VIH está envuelto por una bicapa lipídica obtenida en el proceso de “budding” de la célula hospedadora, y en ella se incluye el complejo glicoproteico gp120/gp41. La glicoproteína gp120 está altamente glicosilada y anclada a la glicoproteína transmembrana gp41 por interacciones no covalentes. En el interior del virus encontramos una matriz sólida formada por la proteína p17, y en su interior la cápside, constituida por la proteína p24, que a su vez contiene la nucleocápside constituida por las proteínas p6/p7. El ARN viral se encuentra dentro de la nucleocápside formando un complejo de ribonucleoproteína asociado con la proteína p7 y tres enzimas esenciales para la replicación viral: la proteasa, la transcriptasa reversa y la integrasa, además de otras proteínas accesorias: Nef, Vif y Vpr (**Figura 8**). Existen otras tres proteínas accesorias, que son sintetizadas una vez que ha ocurrido la infección, con función sobre la célula hospedadora (Rev, Tat y Vpu) que no son empaquetadas en la partícula viral madura.

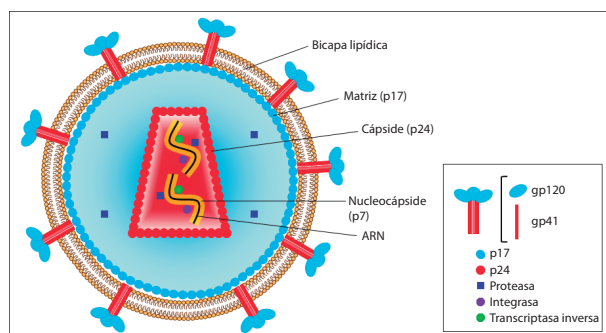


Figura 8: Estructura del VIH-1.

La entrada del VIH en la célula diana requiere la interacción de la glicoproteína viral gp120 con una serie de moléculas en la célula diana. En primer lugar, necesita de la interacción con CD4, y seguidamente requiere que un receptor de quimioquinas, CXCR4 o CCR5, actúe como correceptor (Alkhatib et al, 1996; Doranz et al, 1996; Feng et al, 1996). Las cepas del VIH son clasificadas en función del coreceptor que utilizan para su entrada, diferenciando así cepas X4 o T-trópicas, que utilizan CXCR4 e infectan a las células T CD4⁺, cepas R5 o M-trópicas, que utilizan CCR5 e infectan

a monocitos y macrófagos, y cepas X4/R5 o dual-trópicas que son capaces de utilizar como correceptores tanto CXCR4 como CCR5, pudiendo así infectar todos esos tipos celulares.

Tras esas interacciones, se produce la fusión de la membrana viral con la membrana celular, y la posterior desencapsidación del virus, liberándose al citoplasma el contenido de la cápside viral. A continuación se produce la retrotranscripción del ARN viral, dando lugar a un ADN viral de doble cadena que se transportará al núcleo, y una vez allí, y gracias a la integrasa, el ADN viral puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora y transcribirse. El ARN originado sale al citoplasma donde se procesará, dando lugar tanto a las proteínas virales como al ARN viral. Finalmente se produce el ensamblaje de las proteínas virales y la salida del virión por el proceso de “budding” arrastrando parte de la membrana celular de la célula huésped (**Figura 9**).

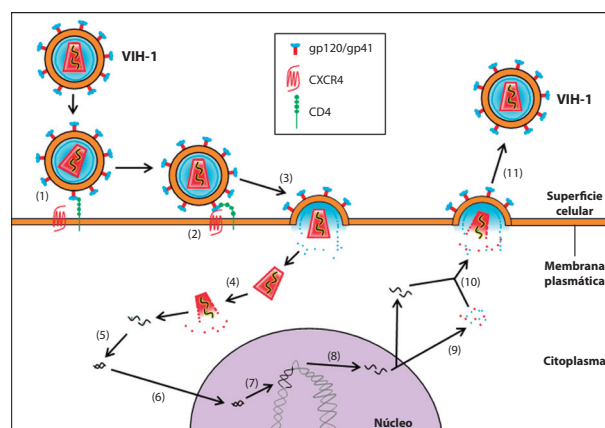


Figura 9: Ciclo viral del VIH-1. Esquema de las distintas etapas del ciclo viral del VIH. En primer lugar se produce la interacción de la gp120 del virus con el CD4 de la célula hospedadora (1), esto promueve un cambio conformacional que permite la interacción de la gp120 con el coreceptor CXCR4 (2), esto desencadena la señalización necesaria para permitir la fusión de las membranas viral y celular (3), posteriormente se produce la desencapsidación del virus (4) y la retrotranscripción (5), el ADN viral resultante es transportado al núcleo (6) donde se integrara en el ADN celular (7). Posteriormente se transcribirá el ARN viral (8) y generando también las nuevas proteínas virales (9), que se ensamblarán para formar las nuevas partículas virales (10) que saldrán de la célula hospedadora por el proceso de “budding” (11) .

5.2.2.-Mecanismos moleculares implicados en la entrada del VIH en la célula diana:

La unión de la glicoproteína gp120 a CD4 promueve un cambio conformacional de la gp120 que expone un dominio denominado “CD4 induced domain”, que junto con la región V3, se encuentran implicados en la interacción con el correceptor (Hartley et al, 2005; Rizzuto et al, 1998). En esas condiciones se produce la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedadora, proceso en el que también está implicada la glicoproteína viral gp41 (Doms & Moore, 2000; Jones et al, 1998).

Se ha descrito que la gp120 promueve la asociación y agrupación de los complejos CD4/CXCR4 y CD4/CCR5 (Barrero-Villar et al, 2009; Basmaciogullari et al, 2006; Lapham et al, 1999), sugiriendo que la entrada del VIH requiere la interacción entre CD4 y los complejos de receptores de quimioquinas. Por otro lado, numerosas evidencias indican que los correceptores CXCR4 y CCR5 están presentes como homo- y heterodímeros en la superficie celular (Hernanz-Falcon et al, 2004; Percherancier et al, 2005; Sohy et al, 2009). Por consiguiente, las variaciones en el ratio CD4/correceptor y las diferencias en los niveles de receptor durante la activación o diferenciación celular podrían correlacionarse con una diferente susceptibilidad a la infección por VIH (Berger et al, 1999; Singh et al, 1999).

5.2.3.-Señalización celular tras la unión del VIH a la célula diana:

Para que la infección del VIH sea efectiva el virus debe entrar en la célula, sintetizar el ADN viral y llegar al núcleo. Estos procesos requieren de una modificación del entorno celular por parte del virus, lo que se consigue con una señalización específica en la célula diana (Cicala et al, 2002). La actina cortical está directamente relacionada con las primeras etapas de la infección viral: la asociación de CD4/CXCR4 (Barrero-Villar et al, 2009; Jimenez-Baranda et al, 2007; Ugolini et al, 1997), la síntesis del ADN viral (Bukrinskaya et al, 1998) y el transporte intracelular (Yoder et al, 2008).

De hecho la actina cortical en reposo es una barrera para la entrada del VIH en las células, y para superarla, el virus utiliza la señalización mediada por CXCR4. En esas primeras etapas de la infección se ha descrito una rápida y transitoria polimerización de actina, seguida de despolimerización (Balabanian et al, 2004; Yoder et al, 2008), lo que mimetiza la señalización que produce CXCR4 en respuesta a CXCL12 (Nishita et al, 2002). En primer lugar la unión de la gp120 a CD4/CXCR4 produce la activación transitoria de la proteína LIMK-1, que inactiva a la cofilina (factor de despolimerización de actina) fosforilándola, de esta manera se permite la estabilización del complejo CD4/CXCR4 (Vorster et al, 2011). Posteriormente se produce la activación de G α i que activa a la cofilina promoviendo de esta manera la despolimerización de la actina, que permite la entrada del virus (Yoder et al, 2008). Seguidamente se produce la fosforilación de LIMK-1, que de nuevo desactiva a la cofilina, promoviendo así una segunda fase de polimerización de actina que permite la síntesis viral (Vorster et al, 2011). Finalmente, se ha demostrado que la activación de la cofilina también juega un papel clave en el transporte del virus al núcleo (Yoder et al, 2008) (**Figura 10**).

Por otro lado, se ha demostrado que la unión inicial de la gp120 a CD4 y CXCR4, también activa la filamina (Jimenez-Baranda et al, 2007) y la moesina (Barrero-Villar et al, 2009) para aumentar el tamaño de los agregados CD4/CXCR4 y hacer más eficiente la infección. La filamina A interacciona directamente con el citoesqueleto de actina y con CD4 o CXCR4 (Jimenez-Baranda et al, 2007), y la moesina sirve de anclaje entre la actina cortical y la membrana plasmática (Barrero-Villar et al, 2009).

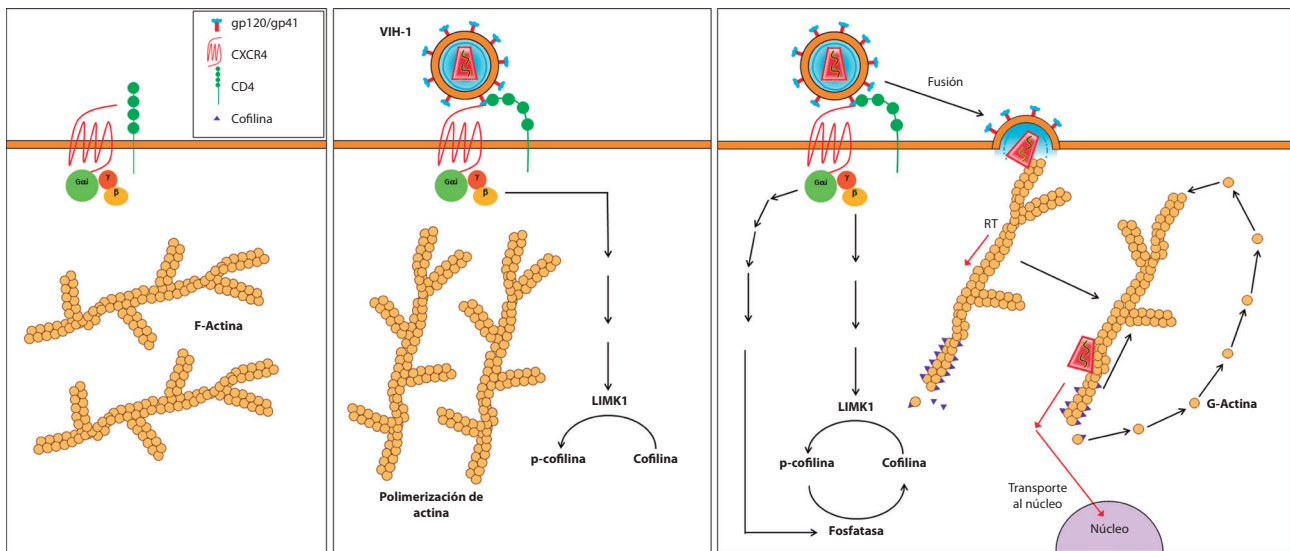


Figura 10: Señalización celular y efectos sobre la polimerización de actina promovida por la unión de la gp120 al complejo CD4/CXCR4. La unión de gp120 a CD4 y CXCR4 activa LIMK1 promoviendo la polimerización de actina. Seguidamente CXCR4 activa cofilina vía Gαi, lo que favorece la despolimerización de la actina permitiendo la entrada viral, produciéndose finalmente la dinámica del citoesqueleto de actina necesario para el transporte viral al núcleo.

II.-OBJETIVOS

II.-OBJETIVOS

Los receptores de quimioquinas forman homo- y heterodímeros en la superficie celular. Son conformaciones muy dinámicas que se regulan por la expresión de los receptores y los niveles de ligandos existentes. Sin embargo apenas hay datos sobre su relevancia funcional, ni sobre los mecanismos celulares que controlan la formación de los complejos oligoméricos. Por ésto proponemos:

1. Estudiar la relevancia funcional asociada a la heterodimerización de receptores de quimioquinas.
 - a. Analizar el efecto de la coexpresión de EBI2 en células B sobre la función de CXCR5/CXCL13.
 - b. Definir el papel de la coexpresión de CCR5 sobre la infección de cepas X4 del VIH-1.
2. Analizar las fuerzas celulares implicadas en la oligomerización de receptores de quimioquinas.
 - a. Determinar el papel del citoesqueleto de actina.

III.-MATERIALES Y MÉTODOS

III.-MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Vectores y construcciones

Los receptores de quimioquinas, CXCR4, CXCR5 y CCR5 se fusionaron a las proteínas fluorescentes CFP, YFP, RFPm y AcGFP, utilizando los vectores pECFP-N1, pEYFP-N1, pERFPm-N1 y pAcGFP-N1 respectivamente. Para clonar estas proteínas quiméricas, amplificamos por PCR y con oligos específicos (**Tabla 2**) los receptores clonados en pcDNA3.1 (cedidos por Bernard Moser, Universidad de Cardiff, UK). CXCR4 y CCR5 fueron clonados en los vectores pcDNA3nYFP (correspondiente al fragmento 1-155 aminoácidos de la YFP) y pcDNA3cYFP (correspondiente al fragmento 156-231 aminoácidos de la YFP) cedidos por el Dr. Rafael Franco (UAB), mediante PCR a partir del vector pcDNA3.1CXCR4 y pcDNA3.1CCR5 utilizando los oligonucleótidos específicos (**Tabla 2**).

En el caso de las construcciones tanto de CD4 como de EBI2, en primer lugar se extrajo ARN a partir de PBLs (linfocitos de sangre periférica) humanos. Se pasó el ARN a ADNc por medio de la transcriptasa inversa, este ADNc se utilizó para amplificar el fragmento de ADN de interés con los oligos específicos para clonarlos en los distintos vectores tanto de expresión (pcDNA3.1), como fusionados a proteínas fluorescentes (pECFP-N1 y pEYFP-N1), así como la proteína fluorescente YFP partida (cYFP y nYFP) y a la luciferasa (pRLuc-N1). En el caso del clonaje de las proteínas de interés fusionadas a las proteínas fluorescentes, se amplificó

el ADN delecionando el codón de parada para que esté en fase con la proteína fluorescente.

2.-Líneas celulares

Las líneas celulares HEK293 y HEK293T Italy (Células embrionarias de riñón humanas), fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas células fueron cultivadas en DMEM (Gibco) suplementado (10% de suero fetal bovino (FBS), 2mM de L-Glutamina y 1 mM de piruvato sódico). Las células HEK293CD4 expresan establemente CD4⁺ humano en la membrana, y son cultivadas suplementando el medio con G418 (100 µg/ml).

La línea celular Jurkat fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), y las Jurkat CD4 fueron cedidas por el Dr. J. Alcamí (Centro de Microbiología, ISCIII). Estas células fueron cultivadas en RPMI (Gibco) suplementado (10% de FBS, 2mM de L-Glutamina y 1 mM de piruvato sódico).

3.-Obtencion de linfocitos B de ratón

Obtuvimos linfocitos B a partir de bazo de ratones C57/BL6 de entre 3-4 meses. Procesamos el bazo por disgregación mecánica y centrifugamos en gradiente de densidad,

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en PCR para realizar las construcciones moleculares.

Clonaje	Diana	Oligos
CXCR5-CFP CXCR5-YFP	5' <i>HindIII</i> 3' <i>AgeI</i>	5'-CTC AAGCTT CGAATTCTGCAGATGGCCTCCTTCAAG-3' 5'- ACCGGT CCAGAACGTGGTGAGAGAGGTGGCATT-3'
CXCR4-CFP CXCR4-YFP CXCR4-mAcGFP	5' <i>HindIII</i> 3' <i>AgeI</i>	5'-AT AAGCTT ATGGAGGGGATCAGTATATACATT-3' 5'- GACCGGT GGATCCCGTAAGCTGGAGTGAAAACCTGAAG-3'
CXCR4-cYFP CXCR4-nYFP	5' <i>NheI</i> 3' <i>EcoRI</i>	5'- GCTAGC ATGGAGGGGATCAGTATATACAC-3' 5'- GAATTCT AAGCTGGAGTGAAAACCTGAAG-3'
CCR5-CFP CCR5-YFP CCR5-RFPm	5' <i>HindIII</i> 3' <i>AgeI</i>	5'-TA AAGCTT ATGGATTATCAAGTGTCAGTCC-3' 5'- GACCGGT AATAACAAGCCACAGATATTTC-3'
CCR5-cYFP CCR5-nYFP	5' <i>NheI</i> 3' <i>EcoRI</i>	5'-A AGCTAGC ATGGATTATCAGTGTCAGTCC-3' 5'- GAATTCT AACAAGCCACAGATATTTC-3'
CCR5-Rluc	5' <i>XhoI</i> 3' <i>HindIII</i>	5'-TT CTCGAG ATGAACCGGGAGTCCCTTTTAG-3' 5'- AAGCTT TAAATGGGGCTACATGTCTTCTG-3'
EBI2 (pcDNA3.1)	5' <i>XhoI</i> 3' <i>BamHI</i>	5'-T ACTCGAG ATGGATATACAAATGGCAAAC-3' 5'- GGATCCT CACTTTCCATTGAAGACTTG-3'
EBI2-CFP EBI2-YFP	5' <i>XhoI</i> 3' <i>BamHI</i>	5'-T ACTCGAG ATGGATATACAAATGGCAAAC-3' 5'- GGATCCT TAACTTTCCATTGAAGACTTG-3'
HA-EBI2 (pcDNA3.1)	5' <i>NotI</i> 3' <i>BamHI</i>	5'-TAG CGGGCCG CATGT ACCCCTACGACGTGCCGACTACGCC GATATACAAATGGAAAC-3' 5'- GGATCCT CACTTTCCATTGAAGACTTG-3'
CD4-Rluc	5' <i>XhoI</i> 3' <i>HindIII</i>	5'-TT CTCGAG ATGAACCGGGAGTCCCTTTTAG-3' 5'- AAGCTT TAAATGGGGCTACATGTCTTCTG-3'

Se destacan las secuencias de las dianas de restricción en **verde**, y en **azul** la secuencia codificante para el epítipo HA.

Lympholyte (1,087 g/ml Cederlane) para obtener los esplenocitos que quedan formando un anillo entre el Lympholyte y el medio. De la fracción celular recogida del ficoll lisamos los eritrocitos, para ello utilizamos una disolución de cloruro amónico (7,5 g/l de NH_4Cl y 2,06 g/l TrisHCl a pH final de 7,2 durante 5 minutos),

después lavamos las células con PBS para eliminar el cloruro amónico. La fracción celular restante la procesamos por selección negativa para obtener los linfocitos B, utilizando Dynabeads (mouse pan T, Invitrogen) como específica el fabricante.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Isotipo	Uso	Casa Comercial	Referencia
B220-PE ratón	Rata IgG	Citometría de flujo	Beckman Coulter	733307
CD3-FITC ratón	Hamster IgG	Citometría de flujo	Beckman Coulter	731979
CD4 humano	Ratón IgG2b	Citometría de flujo Western blot	e-Bioscience	14-0048
CD4-FITC humano	Monoclonal Rata IgG2b	Citometría de flujo	BD Pharmigen	555346
CD69-FITC ratón	Hamster IgG1	Citometría de flujo	Beckman Coulter	553236
CD86-PE ratón	Rata IgG2a	Citometría de flujo	Biolegend	105008
CCR5 humano	Monoclonal	Western blot	R&D	MAB1801
CCR5-FITC humano	Monoclonal Ratón IgG2a	Citometría de flujo	BD Pharmigen	555992
CCR5-PE humano	Monoclonal Ratón IgG2a	Citometría de flujo	BD Pharmigen	555993
CXCR4-biotina humano	Monoclonal Ratón IgG2a	Citometría de flujo	R&D	FAB170B
CXCR4 (CD184)-biotina ratón	Monoclonal Rata IgG2a	Citometría de flujo	BD Pharmigen	551968
CXCR5 humano	Monoclonal Ratón IgG2b	Citometría de flujo	R&D	MAB190
CXCR5-biotina ratón	Monoclonal Rata IgG2a	Citometría de flujo	BD Pharmigen	551960
Estreptavidina-PE	---	Citometría de Flujo	Beckman Coulter	732999
Estreptavidina-SPRD	---	Citometría de Flujo	Beckman Coulter	733003
ERK1	Conejo	Western blot	Santa Cruz	Sc-93
ERK2	Conejo	Western blot	Santa Cruz	Sc-154
Faloidina-FITC	---	Citometría de Flujo	SIGMA	P5282
Faloidina-Alexa488	---	Microscopía	SIGMA	49409
GAPDH	Ratón	Western blot	Santa Cruz	sc-365062
GFP	Monoclonal Ratón IgG2a	Western blot	Clontech	632381
HA.11	Monoclonal Ratón IgG1	Citometría de flujo Western blot	Covance	MMS-101P
IgG1-Cy3 Ratón	Cabra	Microscopía	Jackson	115-166-071
pCofilina	Monoclonal de Conejo	Western blot	Cell Signaling	3313
pLIMK1	Conejo	Western blot	Cell Signaling	3841
pERK1/2	Ratón	Western blot	Santa Cruz	sc-7383

Tabla 4: Reactivos empleados.

Reactivo	Casa comercial	Referencia	Detalle
CCL5 humano	Peprotech	300-06	Quimioquina
Coelenterazina H	PJK	102181	Sustrato de luciferasa
CXCL12 humano	Peprotech	300-28	Quimioquina
CXCL13 humano	Peprotech	300-47	Quimioquina
CXCL13 ratón	Peprotech	250-24	Quimioquina
Deep BlueC	Biotium	10125	Sustrato de luciferasa
Fibronectina	Sigma	F2006	Sustrato integrinas
gp120 _{IIIB}	Immuno-Diagnostic	14-102-050	Glicoproteína del VIH-1
Latrunculina A	Adipogen	AG-CN2-0027	Inhibidor de la polimerización de actina
7 α ,25-Dihidroxicolesterol	Avanti	700080P	Lípido (Oxiterol), ligando de EBI2

4.-Anticuerpos utilizados

(Tabla 3).

5.-Quimioquinas y reactivos

(Tabla 4).

6.-Obtención de linfocitos B humanos

Obtuvimos los linfocitos B a partir de sangre periférica de donantes sanos. Mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Plaque (1,07 g/ml, GE Healthcare) separamos los linfocitos que quedan formando un anillo entre las dos fases. De la fracción celular recogida del ficoll, y tras varios lavados con PBS, y utilizando Dynabeads (Untouched Human B Cells; Invitrogen) purificamos los linfocitos B como especifica el fabricante.

7.-Obtención y nucleofección de linfocitos T CD4⁺ humanos

Obtuvimos los linfocitos T a partir de sangre periférica de donantes sanos. Mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Plaque (1,07 g/ml, GE Healthcare) separamos los linfocitos que quedan formando un anillo entre las dos fases. De la fracción celular recogida del ficoll, y tras varios lavados con PBS, mediante selección negativa y utilizando Dynabeads (Untouched Human CD4 T Cells; Invitrogen) purificamos los linfocitos T CD4⁺ como especifica el fabricante.

Los linfocitos T CD4⁺ (10x10⁶ células) se nucleofectaron (Human T Nucleofector kit, Amaxa) con 5 μ g de CCR5 (pcDNA3.1CCR5) o con 5 μ g del vector vacío (pcDNA3.1), como especifica el fabricante.

8.-Transfecciones celulares

Para los diferentes estudios utilizamos la línea celular HEK293T transfectada transitoriamente con los diferentes vectores utilizando **JetPEI** comercial (Polyplus Transfection) **PEI** (Polietilenimina). Las células fueron plaqueadas el día anterior a 3×10^5 células/ml. Al día siguiente se transfectaron con los vectores deseados. En el caso del JetPEI utilizamos el protocolo del fabricante. Analizamos la expresión de las proteínas transfectadas a las 48 horas mediante citometría de flujo.

Para los experimentos de FRET mediante la técnica de quemado del aceptor o “photobleaching”, tapizamos con fibronectina $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ los cristales de $10 \times 10 \text{ mm}$ en los pocillos de una placa de 24 pocillos durante 1 hora a 37°C . **Posteriormente depositamos las células** (3×10^3 células por pocillo en un volumen de $500 \mu\text{l}$) y las dejamos en cultivo a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$. Al día siguiente transfectamos las células con JetPEI (según condiciones del fabricante) y con los vectores de interés. A las 48 horas de la transfección realizamos los experimentos de FRET.

Para los experimentos de FRET o BRET mediante la técnica de sensibilización del aceptor (curvas de saturación), plaqueamos las HEK293T en placas de 6 pocillos a $3,5 \times 10^5$ células por pocillo en un volumen de 2 ml. Al día siguiente transfectamos con PEI, para ello se prepararon las siguientes mezclas de reacción:

*Mezcla 1: Ponemos $200 \mu\text{l}$ de NaCl 150 mM por cada $8 \mu\text{g}$ de ADN a transfectar y se agita en el vortex. Para cantidades inferiores de ADN se mantienen $200 \mu\text{l}$ de NaCl, y para mayores cantidades escalamos la cantidad de NaCl proporcionalmente.

*Mezcla 2: Se ponen NaCl 150 mM y PEI ($5,47 \text{ mM}$ de residuos de nitrógeno) en una proporción 4:1 y se agita en el vortex. Añadimos la mezcla 2 sobre la mezcla 1 en proporción 1:1 y agitamos con vortex durante 10 segundos y dejamos a temperatura ambiente

entre 15 y 30 minutos. Añadimos aproximadamente 1 ml de DMEM sin suero ni aditivos a cada tubo, y esa mezcla es la que se añade a las células. Se deja la mezcla de transfección durante 4 horas y después se cambia por DMEM suplementado (2 ml por pocillo). A las 48 horas de la transfección realizamos los experimentos de FRET.

9.-Análisis por citometría de flujo

9.1.-Marcaje extracelular

Para estudiar los niveles de expresión de una proteína en la superficie celular usamos citometría de flujo. Para ello ponemos las células en una placa con fondo en “V” de 96 pocillos, a una concentración de 1×10^5 - 2×10^5 células/pocillo en $100 \mu\text{l}$, e incubamos (30 minutos a 4°C) **con los anticuerpos a la concentración adecuada**, diluidos en PBS de tinción (PBS, $0,5\%$ de FBS, 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y $0,025\%$ de azida sódica). Tras la incubación, lavamos las células con PBS de tinción, y en caso de que el anticuerpo primario no estuviera marcado directamente procedemos a la tinción con los anticuerpos secundarios correspondientes de igual modo. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, volvemos a lavar las células con PBS de tinción y finalmente las resuspendemos en PBS frío para analizarlas en un citómetro de flujo (XL, FC500 o Gallios; Beckman Coulter).

Como controles negativos del marcaje utilizamos, células que no expresan la molécula a detectar y anticuerpos control del mismo isotipo que los anticuerpos específicos usados.

9.2.-Cuantificación del número de receptores

Para la cuantificación del número de receptores en la membrana celular, utilizamos el kit comercial, Qifikit (Dako), siguiendo el protocolo del fabricante. Este kit contiene unas bolas de 10 mm de diámetro tapizadas con diferentes, pero conocidas concentraciones de moléculas mAb (anticuerpo monoclonal) de

ratón, que utilizamos para obtener la recta de calibración del anticuerpo secundario empleado, donde luego interpolamos los valores de nuestro problema.

9.3.-Ensayos de internalización y reciclaje del receptor.

Para estudiar la internalización de un receptor tras la estimulación con su ligando utilizamos 5×10^5 células por punto en 500 μ l de medio de depleción. Añadimos el ligando a la concentración deseada, durante distintos tiempos, manteniendo en agitación a 37 °C. Inmediatamente después ponemos las células en hielo y las lavamos con PBS frío. Finalmente realizamos el marcaje de los receptores como se ha indicado anteriormente. Calculamos porcentaje de internalización con los valores medios de la intensidad de fluorescencia, llamando 100% del receptor a los niveles de éste en el tiempo 0, es decir en ausencia de estímulo.

Para el estudio del reciclaje del receptor, estimulamos con el ligando a las células durante el tiempo de máxima internalización. Acto seguido lavamos las células y las dejamos en medio de depleción en agitación y a 37 °C. Transcurrido el tiempo deseado (1 hora y 3 horas) lavamos las células con PBS frío y realizamos el marcaje de los receptores como antes. Calculamos el porcentaje de receptor reciclado a partir del tiempo cero, esto es el de máxima internalización. Como control, analizaremos también la variación de los niveles del receptor en ausencia de estímulo a lo largo del tiempo.

9.4.-Ensayos de movilización de calcio intracelular

Con las células adherentes, como las HEK293T, en primer lugar “despegamos” las células con EDTA al 0,02% en PBS. Las células, tanto adherentes como en suspensión, las resuspendemos a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml, en DMEM o RPMI según corresponda, y las incubamos con la sonda fluorescente Fluo-3 AM (Molecular Probes, Invitrogen; 0,28 μ g/ μ l en DMSO y añadimos 16 μ l por cada 10^6 de células HEK293T; 1 μ g/ μ l en DMSO y añadimos 8 μ l por cada 10^6 de célu-

las B o Jurkat) durante 30 minutos a 37 °C con agitación en oscuridad. Después lavamos las células con medio de cultivo para eliminar los restos de sonda no incorporada. A continuación resuspendemos las células, a una concentración de 5×10^5 células/ml en medio completo suplementado con 2mM de CaCl_2 . Mantenemos las células a 4 °C y oscuridad hasta el momento de evaluación. Antes de la estimulación, ponemos las células a 37 °C durante 5 minutos para atemperarlas, y determinamos la movilización de calcio intracelular en respuesta a los diferentes estímulos mediante citometría de flujo (XL, Beckman Coulter). En todos los ensayos comprobamos la carga celular estimulando con ionomicina. Los histogramas obtenidos los analizamos mediante el programa MTIME o FlowJo.

9.5.-Ensayos de polimerización de actina

Utilizamos células HEK293CD4 (10^6 células) o linfocitos T humanos nucleofectados (2×10^6). Tras el estímulo con gp120_{IIIB} (10 nM) o CXCL12 (50 nM), y posterior fijado con paraformaldehído (4% PFA, 10 minutos, 20 °C), lavamos varias veces con PBS y diferenciamos las células vivas con “violet LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain” (Molecular Probes). Primero teñimos con anti-CCR5-PE (30 min a 4 °C) para identificar las células que expresan CCR5, y posteriormente marcamos las células con Faloidina-FITC diluida en tampón de permeabilización (0,1% Triton X100, 1% BSA, 0,1% suero de cabra, 50 mM de NaCl en PBS; 30 minutos, 4 °C). Analizamos las células teñidas en el citómetro de flujo (Gallios; Beckman Coulter).

9.6.-Ensayos de unión de quimioquina biotinilada

Los ensayos de unión con CXCL12 biotinilado se realizaron usando el kit comercial Fluorokine (R&D) en células Jurkat tratadas previamente con los diferentes inhibidores o sus vehículos.

En primer lugar preparamos el control de especificidad de la unión. Tratamos las células con IgG humana ((10 μ l de 1 mg/ml/ 10^6

células), 15 minutos, 20-22 °C) para bloquear los Fc de las células y así evitar uniones inespecíficas, e incubamos 20 µl del anticuerpo bloqueante con 10 µl de CXCL12-biotinilada (15 minutos, 20-22 °C). Finalmente añadimos 25 µl de las células bloqueadas a la mezcla de quimioquina biotinilada y anticuerpo bloqueante e incubamos (30-60 minutos, 4 °C).

Para la tinción de las muestras, lavamos las células con PBS 1X y las ponemos en una placa con fondo en "V" de 96 pocillos, a una concentración de 1×10^5 células por pocillo en un volumen de 25 µl, y añadimos 10 µl de CXCL12-biotinilada/pocillo. Como control negativo añadiremos en otro pocillo 10 µl de un mA b control biotinilado e incubamos (30-60 minutos, 4 °C).

Tanto en los controles como en las muestras, sin lavar las células añadimos 10 µl de avidina-FITC e incubamos (30 minutos, 4 °C y en oscuridad). Lavamos las células dos veces con el tampón de lavado, y resuspendemos en 200 µl del mismo tampón. Finalmente analizamos las muestras por citometría de flujo (FC500, Beckman Coulter).

10.-Inmunofluorescencia

Tapizamos durante 1 hora a 37 °C cristales (10x10 mm) con Poli L-Lisina (50 µg/ml) o con fibronectina (10 µg/ml). Depositamos las células (entre $3,5 \times 10^4$ y 2×10^5 células por cristal, dependiendo del tipo celular). Una vez adheridas las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 4-5 minutos a temperatura ambiente y lavamos 3 veces con PBS. Para evitar marcaje inespecífico bloqueamos las células, durante 30 minutos a 37 °C, con PBS suplementado con: 1% BSA, 0,1% de suero de cabra y 50 mM de NaCl. Cuando es necesario realizar un marcaje extracelular y otro intracelular, primero marcamos las proteínas de superficie con los anticuerpos correspondientes, y acto seguido permeabilizamos las células (0,1% Triton X100, 1% BSA, 0,1% suero de cabra, 50 mM de NaCl en PBS; 30 minutos, 4 °C) y añadimos los correspondien-

tes anticuerpos. Una vez tenemos las células marcadas, montamos los cristales con medio de montaje (Aqua Poly/Mount; Polysciences), para su posterior análisis en el microscopio. En nuestros ensayos usamos los microscopios confocales Zeiss Axiovert y Olympus IX81, ambos con un objetivo 60x (apertura numérica 1:40).

11.-Western Blot

Lisamos las células ($\sim 3 \times 10^6$ células HEK293T y 10×10^6 células B o T) con 100 µl de un tampón de lisis ((Tritanolamina 20 mM, digitonina 1%) ó (Nonidet-P40, Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM)) que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml y ortovanadato sódico 10 µM) durante 30 minutos a 4 °C en agitación. Centrifugamos a 14000 rpm durante 15 minutos y recogemos el sobrenadante donde se cuantifican las proteínas por el método de Bradford o BCA. Los lisados (40 µg) son separados en geles SDS-PAGE (10-12%), y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Tras bloquear la membrana con BSA (5%) o leche entera (5%) durante 1 hora a temperatura ambiente, incubamos con los anticuerpos primarios toda la noche a 4 °C. Lavamos las membranas con TBS-Tween 0,01% y agua destilada e incubamos, durante 45 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario específico acoplado a peroxidasa. Repetimos los mismos lavados con TBS-Tween 0,01% y agua destilada, y revelamos la película usando ECL comercial (GE Healthcare). Todas las bandas son densitometradas usando el programa ImageJ 1.43u (NIH).

12.-Extracción de ARN

Resuspendemos las células (5×10^6) en 1ml de Tri-Reagent. Posteriormente añadimos 200 µl de cloroformo, agitamos con vortex, dejamos 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos a 4 °C durante 15 minutos a 12000 g para separar el ARN (fase superior acuosa) del ADN (interfase) y de las proteínas

(fase inferior orgánica). Transferimos la fase acuosa a otro tubo y añadimos isopropanol para precipitar el ARN. Lavamos el ARN precipitado con etanol al 75% y finalmente resuspendemos en H₂O. Para comprobar la pureza y concentración del ARN mediremos las muestras obtenidas con el nanodrop.

13.-RT-qPCR

Desde el ARN (1 µg mínimo) preparamos ADNc usando “random hexamers” y retrotranscriptasa AMV. Medimos cada muestra por triplicado, con “SYBR Green PCR Master Mix” y con sus oligos específicos. Repetimos los análisis al menos 4 veces. Cuantificamos la expresión relativa de EBI2 por el método comparativo del ciclo umbral. Los oligos que utilizamos son los siguientes: EBI2, (5'-CAACGGAGGTCCTAGCCAC-3') y (5'-GTTAGCCATTTCTGTATCCAG); y para normalizar cada muestra medimos la β-actina utilizando oligos específicos: (5'-GGCAC-CACACCTTCTACAATG-3') y (5'-TGGAT-GGCTACGTACATGGCT).

14.-Ensayos de migración celular

Para los experimentos de quimiotaxis con linfocitos B de ratón, utilizamos cámaras de transmigración con un tamaño de poro de 3 µm (Costar). Ponemos 3x10⁵ células en la parte superior de la cámara en 100 µl de medio completo (RPMI con 10% de FBS, L-glutamina, HEPES y β-mercaptoetanol), y en la parte inferior ponemos 600 µl del mismo medio con las diferentes concentraciones de quimioquinas. Dejamos las células migrar durante 3 horas a 37 °C con 5% CO₂. Contamos las células que han migrado a la parte inferior de la cámara utilizando un citómetro de flujo (XL, Beckman Coulter) durante 30 segundos a velocidad de flujo fija.

El índice de migración lo calculamos como la relación entre las células que han migrado en respuesta a los diferentes estímulos y las que migraron frente al medio sin quimio-

quinas. Como número máximo de células que pueden migrar, contamos en el citómetro durante el mismo tiempo 3x10⁵ células/600 µl.

15.-Ensayos de fusión celular

Para generar las células diana utilizamos células HEK293CD4 (que expresan CXCR4 endógenamente), cotransfectadas con el plásmido pSCLuc (contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor T7) y pRNull (plásmido para normalizar el contenido de renilla luciferasa) y con cantidades crecientes de CCR5 (pcDNA3.1CCR5). Como control se transfectaron estas células con el plásmido pcDNA3.1 vacío. Para generar las células efectoras, se infectaron células HEK293T con virus vaccinia recombinante (1 hora, 37°C) para que presentaran en la membrana las proteínas gp120_{IIIB} y gp41 del VIH-1. A las 12 horas post-infección, 10⁵ células efectoras cultivadas en presencia de rifampicina (100 µg/ µl) se mezclaron con células diana (6 horas, 37 °C), y se analizó la fusión celular midiendo la actividad luciferasa/renilla en los lisados mediante Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega). Las células HEK293T fueron cotransfectadas con pcDNACCR5 o el vector vacío (pcDNA3.1) y pSCLuc; el plásmido pRNull fue utilizado como control. La actividad de la luciferasa la calculamos como el ratio relativo (luciferasa/renilla)/(luciferasa control/renilla control).

16.-Ensayos de infección con partículas virales NL4-3

La cepa NL4.3, de virus X4 del VIH, fue obtenida del “AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH”. Células T CD4⁺ o células Jurkat CD4 fueron infectadas con 20 ng de VIH-1_{NL4-3}/10⁶ células (2 horas, 37 °C; equivalente a una multiplicidad de la infección 1 ó 2 partículas virales/célula), y lavamos varias veces con medio para eliminar las partículas virales libres. Las células tanto infectadas como no infectadas se mantuvieron en cultivo (24 horas, 37 °C). Finalmente se recogieron los sobrenadantes y se

cuantificó la cantidad de p24 por ELISA (Inno-test HIV-1 antigen mAb; Innogenetics, Ghent, Belgium).

17.-Ensayos de unión de [^{35}S] GTP γ S

Para los ensayos de unión de [^{35}S] GTP γ S usamos membranas celulares que incubamos 1h a 30 °C en tampón de [^{35}S]GTP γ S (0,5 nM [^{35}S]GTP γ S (1.000-1.400 Ci/mmol); 1 mM EGTA; 3 mM MgCl $_2$; 0,2 mM dithiothreitol; 50 μM GDP; 1% BSA libre de ácidos grasos; y 50 mM Tris-HCl pH 7,4) con inhibidores de proteasas. Acto seguido añadimos distintas concentraciones del agonista a valorar (desde pM hasta μM) para determinar la unión de [^{35}S] GTP γ S al receptor estimulado. Para determinar la unión no específica utilizamos 10 μM de GTP γ S sin marcar. Paramos las reacciones por filtración mediante vacío en filtros de papeles Whatman de fibra de cristal, y los lavamos con tampón de lavado frío. La radiactividad que queda unida fue medida en un contador β de centelleo (Beckman).

18.-Ensayos cinéticos de unión de gp120- ^{125}I

Esta técnica nos permite estudiar los parámetros cinéticos de unión del ligando al receptor. Previamente marcamos la gp120 $_{\text{IIB}}$ (5 μg) con ^{125}I (100 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, NEZ033A, PerkinElmer) utilizando el método de la cloramina-T (Lee & Ryan, 1973). Utilizamos las células HEK293T y HEK293CD4 transfectadas tran-

sitoriamente con el vector vacío (pcDNA3.1) o con CCR5 (pcDNA3.1-CCR5). Las células fueron preincubadas durante 15 minutos a 37 °C en agitación con ^{125}I -gp120 $_{\text{IIB}}$ (0,17 nM). Para competir con el ligando radiactivo, añadimos gp120 $_{\text{IIB}}$ desde 5,6 pM hasta 44,8 nM. El ligando radiactivo asociado a las células fue medido en un contador γ (Beckman Coulter) y los datos se analizaron con GraphPad Prism 5.0.

19.-Producción, purificación y caracterización de partículas lentivirales.

19.1.-Producción y purificación de partículas lentivirales

Plaqueamos las HEK293T o HEK293 CD4 $^{+}$ a 3×10^5 células/ml (6×10^6 células en una placa P150). Al día siguiente transfectamos las HEK293T con HA-EBI2, CXCR5, HA-EBI2/CXCR5 y las HEK293 CD4 $^{+}$ con pcDNA3.1 (vector vacío) o pcDNA3.1-CCR5. 24 horas después, transfectamos las células con los plásmidos pLVTHM/GFP, psPAX2 y pCMV-VSVG, necesarios para generar las partículas lentivirales. A las 72 horas recogemos el sobrenadante del cultivo y lo centrifugamos a 3000 rpm durante 30 minutos (para eliminar los restos celulares de gran tamaño). Posteriormente, purificamos las partículas virales sobre un gradiente de sacarosa al 20% en PBS, por ultracentrifugación en un rotor SW55 Beckman (26.000 rpm, 2 horas, 4 °C). Resuspendemos en PBS las partículas lentivirales precipitadas

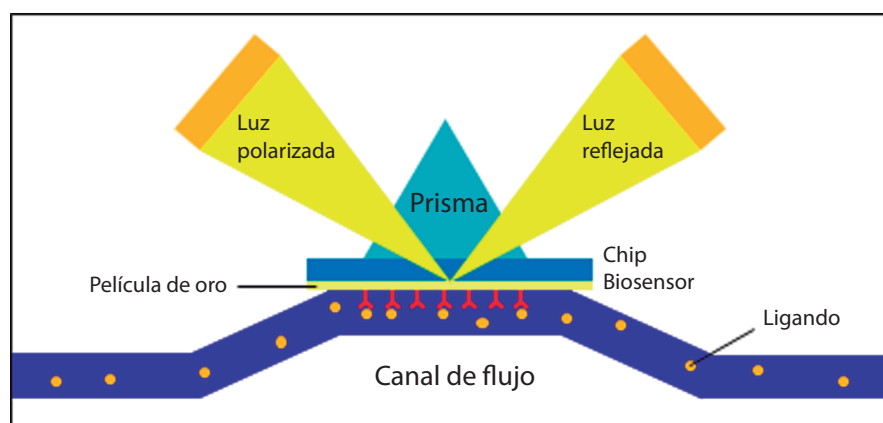


Figura 11: Principio de resonancia del plasmón superficial. La luz incidente es reflejada y el detector es capaz de transmitir la señal y convertirla en una curva medible.

tras la ultracentrifugación, y repetimos una segunda ultracentrifugación (37.000 rpm durante 45 minutos y a 4 °C) en gradiente de sacarosa (20-50%) para así obtener una mayor pureza de las partículas lentivirales.

19.2.-Titulación de las partículas lentivirales

Plaqueamos HEK293T (4×10^4 células/ml en pocillos de placas de 24). A las 24 horas infectamos las células con diluciones seriadas (1/2) de las partículas lentivirales (dejamos un pocillo sin infectar para contar el número de células). Después de 72 horas despegamos las células y las analizamos por citometría de flujo, detectando el porcentaje de infección en las células que son verdes (GFP⁺). Calculamos las TU (del inglés “transforming units”) por ml de partícula lentiviral.

19.3.-Acoplamiento de las partículas lentivirales a bolas de látex

Dado que las partículas lentivirales poseen un tamaño muy pequeño para ser detectadas por citometría de flujo, unimos las partículas lentivirales a bolitas de látex (4 µm), lo que les dará tamaño y complejidad suficiente para su detección.

En primer lugar sonicamos las bolas de látex durante al menos 5 minutos, para así disgregarlas. Una vez disgregadas mezclamos en proporción (v:v) 1:1 las bolas de látex con las partículas virales y las dejamos durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguidamente se añade 1 ml de PBS y se deja 1 hora en agitación a 4 °C. Después, añadimos glicina (100 mM, 30 minutos en agitación) y centrifugamos (4.000 rpm, 3 minutos) para eliminar el sobrenadante. Finalmente lavamos las bolas con PBS/BSA al 5% y resuspendemos la mezcla para iniciar la tinción con los anticuerpos deseados como si fuese un experimento de marcaje normal que luego analizamos por citometría de flujo (Gallios, Beckman Coulter).

20.-Ensayos cinéticos por Biacore

Para estudiar la afinidad del ligando por su receptor, usamos un biosensor óptico (Biacore 3000, GE Healthcare) que mide las interacciones entre moléculas utilizando la resonancia de plasmón superficial (**Figura 11**).

En primer lugar inmovilizamos en el biosensor las partículas lentivirales previamente generadas. Para ello utilizamos un chip comercial (CM5, GE Healthcare) que presenta cuatro canales con una matriz de dextrano carboximetilado ensamblado covalentemente a una superficie de oro. Las moléculas se acoplan covalentemente por grupos amino a la superficie del biosensor. Utilizamos una mezcla de NHS (N-hidroxisuccinimida, 0,1M) y EDC (1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil) carbodiimida, 0,4 M) para activar la superficie del chip (5 µl/min, 25 °C). Como flujo continuo utilizamos HBS-P (10 mM Hepes, 0,15 M NaCl, 0,005% polioxietileno sorbitan P20 (surfactante comercial para disminuir las señales inespecíficas y estabilizar la señal) a pH 7,4). Todos los tampones son filtrados previamente por un filtro de 0,22 µm. Las partículas lentivirales se diluyeron en tampón de acetato (10 mM, pH 4) y se inyectaron sobre la superficie (5 µl/min, 5 min, 25 °C), seguidamente la etanolamina (1M, pH 8,5; 5 µl/min, 7 min, 25 °C) para bloquear todos los sitios de unión inespecífica. En nuestros experimentos inmovilizamos ~6.000 RU de partículas lentivirales.

Finalmente realizamos los análisis cinéticos en Biacore. El tampón de flujo continuo es el PBS-P (0,005 %) a una velocidad constante (30 µl/min). Las muestras fueron diluidas en PBS-P e inyectadas sobre la superficie del sensor a una velocidad constante (30 µl/min), donde la fase de asociación (3 min) va seguida de la fase de disociación (5 min). La superficie se recupera con una inyección de HCl (5 mM) para que vuelva a ser usada. Los sensogramas obtenidos son corregidos substrayendo la señal obtenida en los canales de referencia, como son el canal vacío, que se activa y desactiva sin unir viriones y los canales que llevan partículas lentivirales que no presentan el receptor que

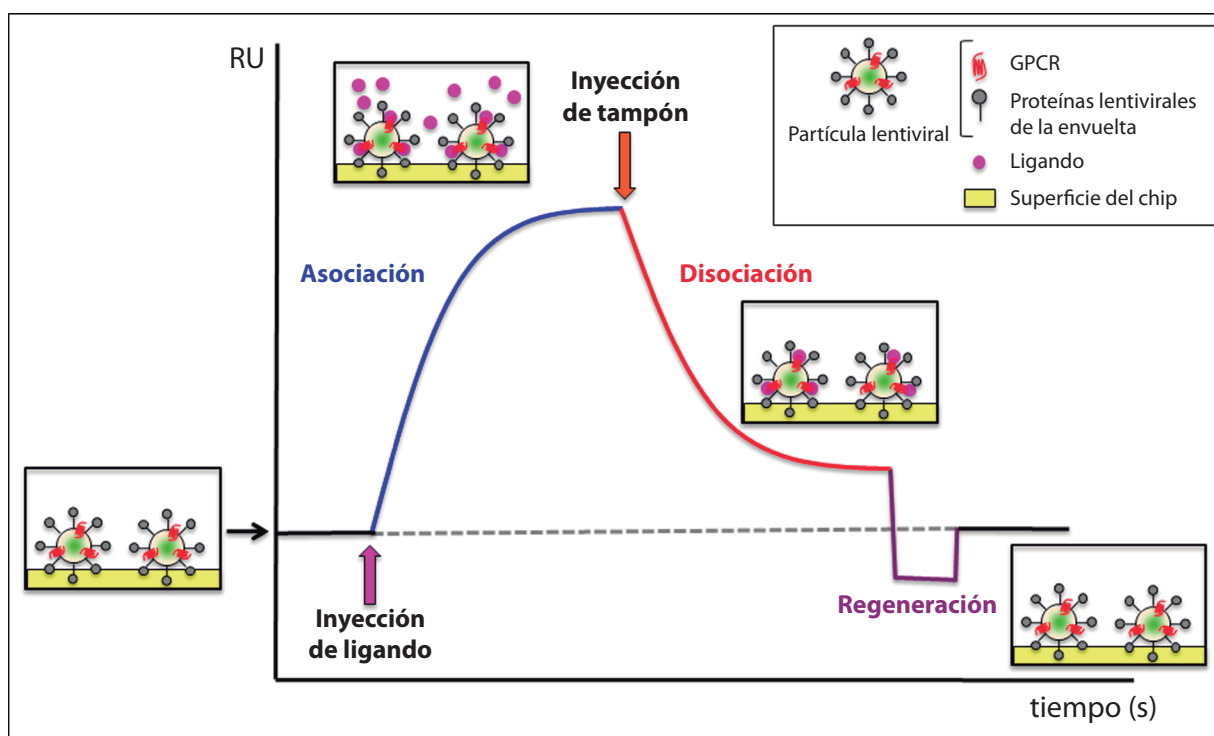
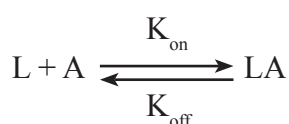


Figura 12: Sensorgrama, representación de los datos del biosensor. El sensorgrama es la curva que representa los cambios en el índice de refracción debidos a las fases de asociación y disociación de los complejos que se forman en la superficie entre ligando y receptor a tiempo real.

une el ligando a estudiar (LVHA-EBI2 o LVP CXCR4 y LVP CXCR4/CCR5 respectivamente). Todos los pasos son llevados a cabo por un sistema automático robotizado, y se siguen en tiempo real para visualizar cualquier cambio de RU del índice de refracción (**Figura 12**). Las curvas derivadas de estos ensayos son usadas para el cálculo de las constantes cinéticas y de afinidad. El análisis de los sensorgramas se hizo siguiendo los ajustes según el modelo de Langmuir de interacción 1:1 (Bievaluation 4.1 software).

Modelo simultáneo para k_{on} , k_{off} y KD (Langmuir):



$$KD = k_{off}/k_{on} = [A] \times [L] / [AL]$$

k_{on} : Constante de asociación (M/s)

k_{off} : Constante de disociación (s^{-1})

KD : Constante de afinidad (M)

21.-Técnicas de transferencia de energía resonante (RET).

21.1.-Curvas de Saturación de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Esta técnica nos permite detectar la interacción entre dos proteínas en una población celular. La transferencia de energía se produce entre dos proteínas fluorescentes, la dadora (CFP) y la aceptora (YFP), que están fusionadas al extremo C-t (Carboxilo terminal) de los receptores que queremos estudiar. Transfectamos las células con una cantidad constante del receptor fusionado a la CFP y cantidades crecientes del otro receptor fusionado a la YFP, de esta manera podemos analizar los datos de variación de la eficiencia de la transferencia de energía ("FRET efficiency") con respecto al ratio YFP/CFP, obteniendo una curva que llega a saturación. Con esta gráfica podemos calcular dos parámetros, FRET máximo ($FRET_{max}$) y FRET 50 ($FRET_{50}$). El valor de $FRET_{50}$ nos da información sobre la afinidad aparente del par estudiado, que depende directamente de la orientación y distancia de los fluoróforos (**Figura 13**).

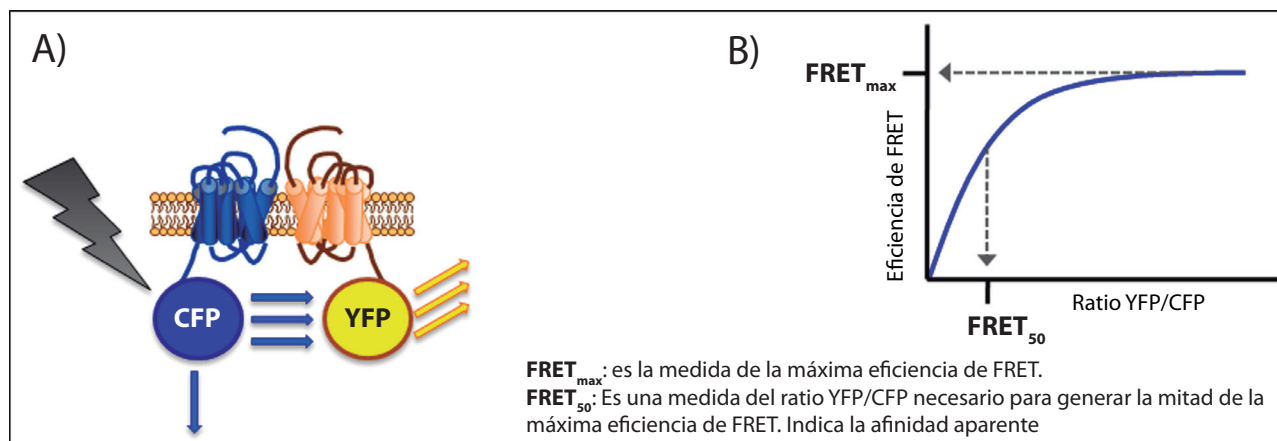


Figura 13: Esquema del fundamento de la técnica de FRET. A) Esquema de la transferencia de energía entre dos receptores que interaccionan. B) Representación esquemática de los datos obtenidos por este método.

Para estos ensayos como controles utilizamos las células sin transfectar, las células transfectadas sólo con el receptor fusionado a CFP, y las células transfectadas sólo con el receptor fusionado a YFP.

Utilizamos HEK293T que transfectamos transitoriamente. A las 48 horas de la transfección despegamos las células con HBSS + 0,1% de glucosa, las centrifugamos (1.500 rpm, 37 °C, 5 minutos) y resuspendemos en el mismo medio. Cuantificamos la cantidad de proteína que tenemos en cada punto por el método de Bradford y ajustamos todos los puntos para dejarlos a una concentración de 0,2 µg/µl. Ponemos, por duplicado, 100 µl de la suspensión celular en una placa negra de 96 pocillos y procedemos a la lectura de la fluorescencia (Wallac Envision 2104 Reader). Para las lecturas de FRET utilizamos una lámpara de xenón, un filtro de excitación de 405 nm, con un paso de banda de 8 nm (397-413 nm), y 2 filtros de emisión, 486 nm y 530 nm con 10 nm de paso de banda (476-496 y 520-540 nm respectivamente). Ajustamos las condiciones a las cuales recogemos la emisión de la luz en los dos canales y las mantenemos en todos los experimentos para mantener la contribución relativa de los fluoróforos en los canales de detección.

Para los ensayos de competición de FRET, transfectamos 24 horas antes con Jet-PEI, las células HEK293T con el receptor competidor o con el plásmido vacío. Posteriormente

plaqueamos esas células transfectadas en placas de 6 pocillos, y cotransfectamos con PEI, cantidades constantes del receptor fusionado a CFP y cantidades crecientes del receptor fusionado a YFP. Realizamos los ensayos de las curvas de FRET de la misma manera. Analizamos las curvas obtenidas como datos pareados (ausencia o presencia del competidor) del ensayo, obteniendo un p-valor (si $p < 0,05$ las curvas son distintas).

Para los ensayos de competición de FRET por la adición de ligando procedemos como para los ensayos normales de FRET hasta el momento de añadir la suspensión celular a la placa negra de lectura. En ese momento añadimos el ligando a valorar o PBS sólo, en cada pocillo de la placa negra. Incubamos las células (37° C en agitación) y leemos la fluorescencia (Wallac Envision 2104 Reader). Analizamos datos obtenidos como datos pareados comparando los datos obtenidos tras la adición del ligando con los obtenidos tras la adición del PBS (vehículo).

Para el cálculo de la eficiencia de FRET, es necesario calcular previamente el entrecruzamiento entre estas dos proteínas fluorescentes, es decir, qué cantidad de fluorescencia procedente de excitar a la proteína CFP (dadora) se recoge en el canal de la YFP (aceptora) en ausencia de ésta, para lo que sólo utilizamos células que expresan CFP o viceversa. De esta manera normalizamos los valores obtenidos en las células que estén coexpresan-

do ambas proteínas, y donde valoramos si realmente se produce transferencia de energía entre los fluorocromos. Para determinar la cantidad de fluorescencia que está emitiendo cada fluoróforo de manera individual en los experimentos de FRET se utilizan las siguientes fórmulas (Zimmermann FEBS 2002):

$$Q = Ch_{510} / Ch_{530}$$

$$R = (YFP_{530nm} Q - YFP_{510nm}) / (CFP_{530nm} Q - CFP_{510nm})$$

$$S = Ch_{510} + Ch_{530}$$

Ch510: Señal detectada a 510 nm.

Ch530: Señal detectada a 530 nm.

$$FluoCFP = S / (1 + (1/R))$$

$$FluoYFP = S / (1 + R)$$

$$FRET_{eff} = FluoYFP / S$$

FluoCFP: Contribución normalizada de la CFP.

FluoYFP: Contribución normalizada de la YFP.

FRET_{eff}: Eficiencia de FRET

21.2.-Curvas de saturación de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)

Esta técnica, al igual que la del FRET, nos permite detectar la interacción entre dos proteínas. En este caso la transferencia de energía se produce entre la luciferasa y la proteína fluorescente aceptora ya sea CFP (BRET²) o YFP (BRET¹), que están fusionadas al extremo C-t (Carboxilo terminal) de los receptores que

queremos estudiar. Dependiendo de la proteína aceptora se utilizan distintos sustratos para la luciferasa:

-BRET²: se utiliza como sustrato el DeepBlueC, con este sustrato la luciferasa cataliza una reacción que emite energía en una longitud de onda de unos 405 nm lo que permite excitar a la CFP. Se toman las medidas 30 segundos después de añadir el sustrato (**Figura 14**).

-BRET¹: se utiliza como sustrato la Coelenterazina H, con este sustrato la luciferasa cataliza una reacción que emite energía en una longitud de onda de unos 510 nm lo que permite excitar directamente a la YFP. Se toman medidas 1 minuto después de añadir el sustrato (**Figura 14**).

Transfectamos las células con una cantidad constante del receptor fusionado a la luciferasa (dador) y cantidades crecientes del otro receptor fusionado a la proteína fluorescente, CFP o YFP (aceptor). De esta manera podemos analizar los datos de variación de la eficiencia de la transferencia de energía (BRET efficiency) respecto al ratio YFP/Luciferasa o CFP/Luciferasa según corresponda, obteniendo una curva que llega a saturación en la cual podemos calcular unos valores de BRET máximo (BRET_{max}) y BRET 50 (BRET₅₀). El BRET₅₀ nos da información sobre la afinidad aparente del par estudiado, que depende directamente de la orientación y distancia de la luciferasa y la proteína fluorescente.

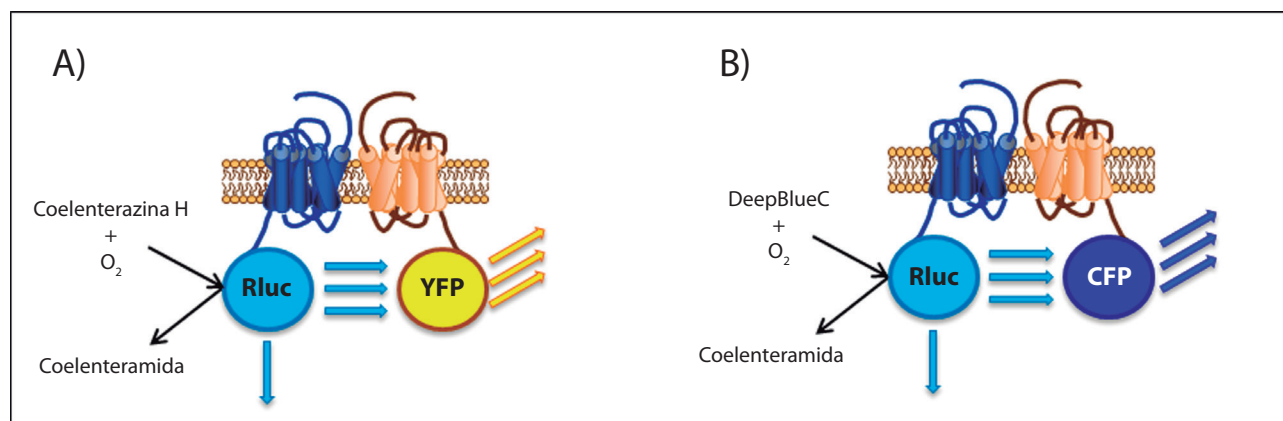


Figura 14: Esquema de la técnica de BRET. A) Esquema representativo de BRET¹. B) Esquema representativo de BRET².

Para estos ensayos como controles utilizamos células sin transfectar y transfectadas sólo con luciferasa (cantidad constante) que tomaremos como los valores de referencia, que restaremos a las lecturas obtenidas de los distintos ratios.

Estos ensayos se realizan de forma similar a los ensayos de FRET. A diferencia de que en este caso ponemos las células en una placa blanca de 96 pocillos para hacer las lecturas de bioluminiscencia, mientras que para cuantificar tanto la CFP como la YFP utilizamos placas negras de 96 pocillos (Wallac Envision 2104 Reader). Para las lecturas de BRET¹ utilizamos un filtro de 405 nm de 8 nm de paso de banda y otro de 530 nm de 10 nm de paso de banda (520-540 nm), mientras que para las lecturas de BRET² utilizamos un filtro de 405 nm de 8 nm de paso de banda y otro de 486 nm de 10 nm de paso de banda (476-496 nm).

21.3.-SRET (Sequential Resonance Energy Transfer)

Esta técnica es un BRET/FRET secuencial, que se basa en acoplar la técnica de BRET con la técnica de FRET, lo que nos permite estudiar la interacción entre tres proteínas. Tiene el mismo fundamento que las curvas de BRET, solo que en este caso tenemos una proteína fusionada a la luciferasa, otra proteína fusionada a la CFP y una tercera proteína fusionada a la YFP. Si existiera el trímero al añadir el DeepBlueC la emisión de bioluminiscencia excitaría la CFP y la energía emitida por ésta excitaría a la YFP que entonces sería detectada (Figura 15).

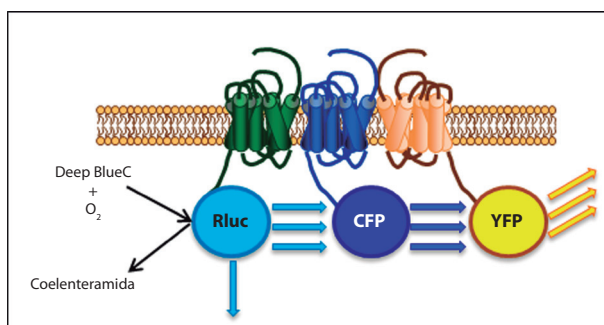


Figura 15: Esquema representativo de la técnica de SRET.

Para ello cotransfectamos las células con cantidades constantes de la proteína dadora del BRET (Rluc) fusionada al extremo C-terminal de uno de los receptores que queremos estudiar y de la proteína aceptora del BRET y dadora del FRET (CFP) fusionada al extremo C-terminal de otro de los receptores que queremos estudiar y cantidades crecientes de la proteína aceptora del FRET (YFP) fusionada al extremo C-terminal del otro receptor que queremos estudiar. En el caso de que exista interacción, obtendremos valores de eficiencia de SRET positivos (emisión detectada de la YFP), que aumentarán, en función del ratio YFP/Rluc, en forma de curva hiperbólica.

Para estos ensayos como controles utilizamos células cotransfectadas con cantidades constantes del receptor fusionado a luciferasa y del receptor fusionado a CFP. Tomaremos éstos como valores de referencia, restándolos a las lecturas obtenidas de los distintos ratios (YFP/Rluc).

Estos ensayos se realizan de forma similar a los ensayos de FRET y BRET. Utilizamos una placa blanca de 96 pocillos para hacer las lecturas de BRET, mientras que para realizar las lecturas de fluorescencia utilizamos placas negras de 96 pocillos, finalmente procedemos las lecturas (Mithras LB940 multimode reader, Berthold Technologies). Para las lecturas de SRET utilizamos un filtro de 400 nm (370-430 nm) y otro de 530 nm (510-560 nm).

21.4.-BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)

La BiFC es un tipo de ensayo de detección de fluorescencia a partir de una proteína fluorescente fragmentada. Para ello la proteína fluorescente se fragmenta en dos mitades que no son capaces de emitir fluorescencia por sí solas, sino que necesitan unirse; lo que se produce si las dos proteínas a las que están fusionadas interaccionan. Para realizar estos experimentos, en primer lugar fusionaremos la parte C-terminal de la YFP (cYFP) al extremo C-terminal de un receptor, mientras que la

parte N-terminal de la YFP (nYFP) la fusionaremos al extremo C-terminal del otro receptor.

Cuando realizamos los ensayos de BiFC, observamos emisión de la YFP cuando existe interacción entre los receptores, ya que los dos fragmentos se localizan lo suficientemente juntos (**Figura 16**). Como controles negativos utilizamos células HEK293T transfectadas con nYFP o cYFP vacíos, células cotransfectadas con nYFP vacío y cYFP fusionado a uno de los receptores y *viceversa*.

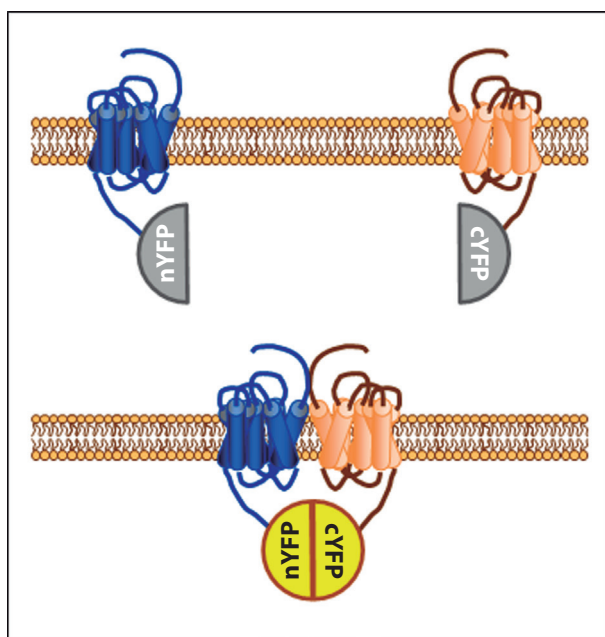


Figura 16: Esquema representativo de la técnica de BiFC.

21.5.-BRET-BiFC

Esta técnica de BRET-BiFC se basa en acoplar la técnica de BRET con la técnica de BiFC, lo que nos permite detectar la interacción entre tres proteínas. Para estos ensayos cotransfectamos las HEK293T con cantidades constantes del receptor fusionado a la proteína dadora (Rluc) y cantidades crecientes de las proteínas fusionadas a los 2 fragmentos de la proteína aceptora (cYFP y nYFP) a un ratio 1:1.

En el caso que exista interacción entre las tres proteínas, obtendremos valores de eficiencia de BRET positivas (emisión detectada de la YFP), que aumentarán en función del ratio YFP/Rluc en forma de curva hiperbólica (**Figura 17**).

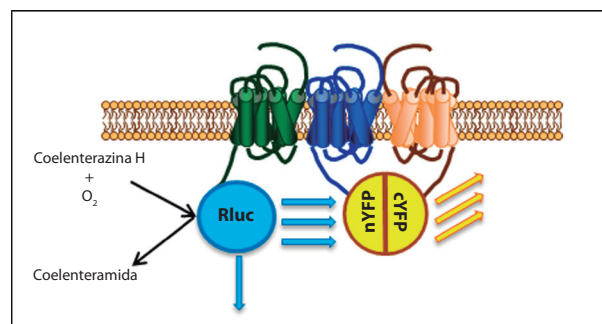


Figura 17: Esquema representativo de la técnica de BRET-BiFC.

21.6.-“Photobleaching” o quemado del aceptor

Esta técnica nos permite localizar la interacción entre dos proteínas célula a célula. Al igual que en las curvas de saturación de FRET, la transferencia de energía se produce entre la proteína fluorescente dadora (CFP) y la aceptora (YFP). El “photobleaching” o quemado del aceptor es una propiedad intrínseca de un fluorocromo (en nuestro caso, YFP) caracterizada por la desaparición de su fluorescencia tras una exposición continuada a la longitud de onda a la que es excitada (515 nm). En esta técnica analizamos la señal emitida por la proteína dadora (CFP), cuando es excitada a su longitud de onda. Si existe interacción entre la proteína dadora (CFP) y aceptora (YFP) y por tanto transferencia de energía, la emisión de la proteína dadora (CFP) estará disminuida. En ese caso, después de quemar (bleach) el aceptor (YFP), al excitar la proteína dadora (CFP), observaremos un aumento o recuperación en la señal emitida por la CFP. De esta manera, valoramos la dimerización y localización de los receptores de quimioquinas (**Figura 18**).

Utilizamos cristales de 10x10 mm estériles sobre los que plaquearemos las HEK293T. Antes de plaquear las células, tapizamos los cristales con FN (20 µg/ml, 1 hora a 37 °C). Ponemos 5x10⁴ células/cristal en una placa de 24 pocillos. 24 horas más tarde transfectamos las células con las construcciones deseadas. A las 48 horas de la transfección fijamos las células con paraformaldehído al 4% durante 3-4 minutos, lavamos 3-4 veces

con PBS y las montamos en los portas (glicerol 80%, PBS 20% a pH 7,0). Analizamos las muestras mediante microscopía confocal, utilizando un láser diodo de 405 nm para excitar la CFP y un láser de Argón de 515 nm para excitar la YFP, utilizando un espejo dicróico dual 405-440/515 nm. La fluorescencia emitida pasa a través de un espejo dicróico de SDM 510 nm siendo recogida por un detector de rango 530-570 nm. Los datos recogidos de la intensidad de fluorescencia tanto de la CFP (ICFPpre) como de la YFP (IYFPpre) proceden de imágenes con una media de 4 barridos por píxel y digitalizada a 12 bits. Para quemar la YFP utilizamos el láser de Argón a su máxima potencia hasta quemar aproximadamente el 80% de la YFP (~3-5 segundos). Después del quemado de la YFP medimos de nuevo, con los mismos parámetros, la fluorescencia de la CFP (ICFPpost) y de la YFP (IYFPpost). La eficiencia de FRET la calculamos utilizando el programa ImageJ 1.43u (NIH). Para el cálculo de la eficiencia de FRET, el módulo utilizado mide píxel a píxel la región señalada, teniendo en cuenta el número de píxeles de la CFP y de la YFP antes y después del quemado de la proteína aceptora, además del porcentaje de quemado de la YFP. Restamos en cada imagen y para cada región analizada la eficiencia de FRET de una zona no quemada (fondo). Calculamos la eficiencia de FRET con la siguiente fórmula:

$$E_{\text{FRET}} = ((\text{ICFPpost} - \text{ICFPpre}) / \text{ICFPpost}) \times 100$$

Como control negativo utilizamos células transfectadas sólo con CFP, valorando antes y después de quemar, los valores en la intensidad (píxeles) de la CFP. La eficiencia de FRET la calculamos como media de al menos tres experimentos, tomando al menos 50 imágenes de cada uno y eligiendo para analizar sólo aquellas imágenes que tienen un ratio (YFP/CFP) correspondiente al que permite alcanzar la máxima eficiencia de FRET en las curvas de saturación.

22. Producción y purificación de la proteína AcGFP dimérica.

A partir del vector pAcGFP1-N1 (Clontech) y utilizando oligonucleótidos específicos, amplificamos por PCR la proteína AcGFP para clonarlo en el vector pET22b(+). Mutamos el codón de parada por una cisteína. A continuación de la cisteína añadimos la secuencia de corte de la trombina y las 6 histidinas del vector.

5' NdeI (5' AACATATGGTGAGCAAGGGC-GCCG 3') 3' BamHI (5' GGATCC-GAGCTGCCACGCGGAACCAGACACTT-GTACAGCTCATCCATG)

Transformamos el plásmido pET22b(+) que contiene la proteína AcGFP en bacterias BL21. Picamos una colonia y la dejamos creciendo

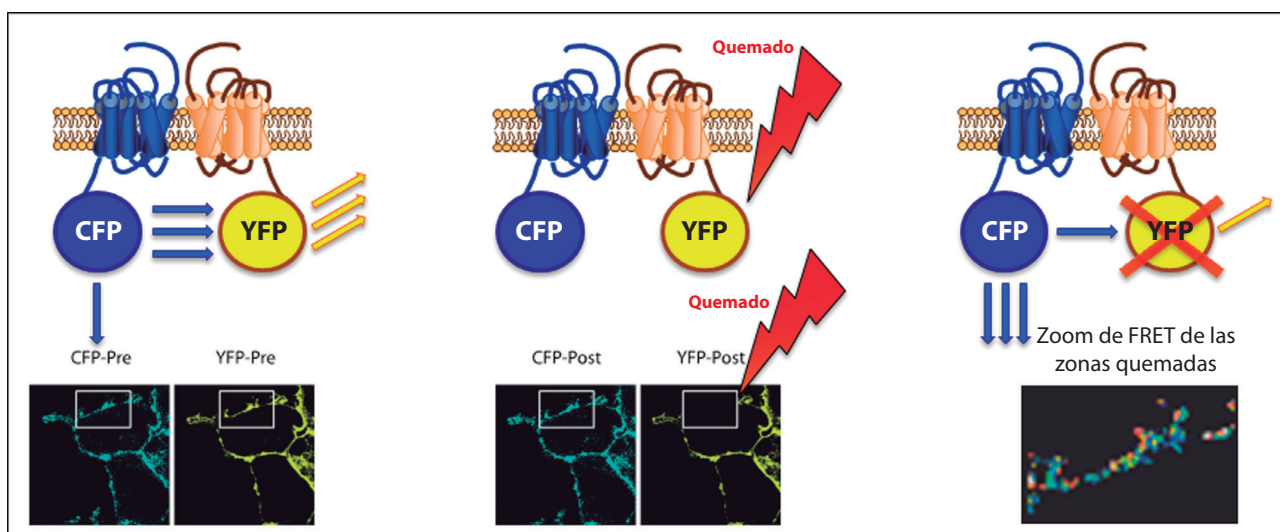


Figura 18: Esquema representativo del “photobleaching” o quemado del aceptor.

durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se añaden 0,5 ml de las bacterias crecidas a 500 ml de LB más antibiótico (en total se pone un volumen de 1 litro). Se deja creciendo hasta que la DO a 600 nm sea de 0,6 (tarda unas 3-4 horas en alcanzar esa DO). Entonces se separa 1ml de las bacterias en un tubo de 10 ml y al resto del matraz se le añade el IPTG a 0,1 mM durante 4 horas. Se recogen unos 40-50 μ ls de las bacterias crecidas sin y con IPTG para correr un gel al 12% (el gel se tiñe con azul Coomassie durante 30 minutos a temperatura ambiente, y después se destiñe hasta que se vean las bandas). El resto se centrifuga a 6.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se tira el sobrenadante y el pellet se congela. Al día siguiente, lisamos el pellet bacteriano con 5 ml de 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl y 10 mM de imidazol, pH 8.0 más inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina, PMSF y ortovanadato sódico). Congelamos y descongelamos 3 veces, para ello usamos nieve carbónica más etanol (así se facilita la congelación de las bacterias resuspendidas). Para descongelar las bacterias se utiliza un baño a 30 °C. Sonicamos 3 veces, en el sonicador de “low power”, a la máxima intensidad durante 40 segundos, manteniendo en hielo durante 1 minuto entre cada sonicación. Se centrifuga a 23.000 g en la Sorvall con el rotor SS34 durante 30 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se diluye hasta 50 ml de PBS más 10 mM de imidazol. Se filtra por 0,45 μ M. Lo pasamos por una columna de cobalto, previamente equilibrada con 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl y 10 mM de imidazol. Después lavamos con PBS más 10 mM de imidazol y luego eluimos con PBS más 300mM de imidazol. Las fracciones de la elución las corremos en un gel de proteínas al 12% en condiciones reducidas y no reducidas. Las fracciones de interés las concentramos y las pasamos por una columna de exclusión molecular S200. Concentramos hasta que nos quede un volumen de 0,5 ml. Esta columna la equilibramos previamente con PBS. De las fracciones que recogemos de aproximadamente 1 ml (flujo de unos 40) se vuelven a correr en un gel de proteínas al 12%, se tiñe con azul Coomassie, y luego se destiñe hasta que veamos las bandas. Congelar alícuotas de las fracciones de interés a -20°C.

23.-Total internal reflection microscopy (TIRF-M)

Esta técnica nos permite estudiar la dinámica de las proteínas en la membrana celular (**Figura 19**). Utilizamos CXCR4 fusionado a la proteína GFP monomérica (AcGFP). Las células Jurkat CD4 (20×10^6 células) fueron electroporadas con 20 μ g de CXCR4-AcGFP (280 V, 975 μ F) en 400 μ l de RPMI suplementado. A las 24 horas de ser electroporadas, fueron seleccionadas las células GFP⁺ por citometría de flujo (“sorting”). Sobre los cristales previamente tapizados con FN (20 μ g/ml) o FN+CXCL12 (100 nM, 1 hora a 37 °C y 5% de CO_2) depositamos 3×10^5 células por cristal en un volumen de 220 μ l de HBSS + 2% de FBS. Dejamos a las células depositándose durante 30 minutos a 37 °C y 5% de CO_2 . Utilizando un microscopio de TIRF (Leica AM TIRF) con un objetivo de aceite de inmersión 100x. Tomamos las imágenes en TIRF con una penetrancia de la onda evanescente de ~90 nm para asegurarnos valorar sólo las proteínas de la membrana. Las imágenes fueron adquiridas con una potencia de láser del 15% con un tiempo de exposición de 40 ms (para evitar el quemado de la muestra), adquiriendo una imagen cada 95 ms (~500 imágenes acumuladas).

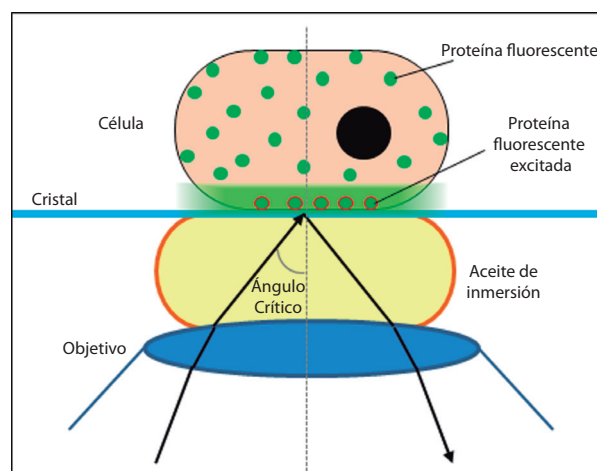


Figura 19: Fundamento del TIRF-M.

Calculamos el coeficiente de difusión (D) de las partículas de receptor a partir de la media del desplazamiento al cuadrado (MSD, del inglés “mean square displacement”), siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{MSD}(t) = \text{MSD}(n\Delta t)$$

$$\text{MSD}(t) = 1/N \sum_{i=1}^N [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2],$$

Donde t es el intervalo de tiempo de cada imagen del vídeo (95 milisegundos), n es el número de “frames” y la (x,y) es la posición de la partícula en cada frame.

En el caso de difusión Browniana el MSD aumenta linealmente con el incremento del tiempo.

El coeficiente de difusión para trayectorias individuales fue determinado a partir de los cinco primeros puntos de las curvas del MSD. Ajustamos a los cinco primeros puntos ya que el error en el MSD aumentó a partir de este punto con el incremento del tiempo.

$$\text{MSD} = 4 D n\Delta t$$

IV.-RESULTADOS

IV.-RESULTADOS

1.-Análisis del efecto de la coexpresión de EBI2 sobre la función del eje CXCR5/CXCL13

1.1-CXCR5 y EBI2 forman homo- y heterodímeros

Para detectar si CXCR5 y EBI2 forman complejos diméricos en las células utilizamos el método de sensibilización del aceptor, mediante las curvas de saturación de FRET.

Para ello primero fusionamos las proteínas fluorescentes dadora (CFP) y aceptora (YFP) en el extremo C-terminal de dichos receptores y comprobamos mediante ensayos de movilización de calcio que la presencia de la proteína fluorescente no altera la funcionalidad de los receptores. Observamos que tanto CXCR5-CFP, como EBI2-CFP promueven movilización de calcio intracelular en respuesta a sus ligandos (**Figura 20**). También analizamos que las células transfectadas expresan niveles fisiológicos de los receptores, y para ello cuantificamos los niveles de los receptores mediante el kit Dako Cytomation Qifikit. Observamos que eran muy similares a los expresados en células B primarias (**Tabla 5**).

Para obtener las curvas de saturación de FRET transfectamos transitoriamente células HEK293T con cantidades constantes del receptor fusionado a la proteína dadora (EBI2- o

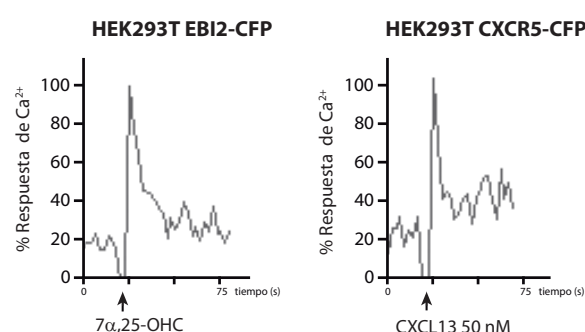
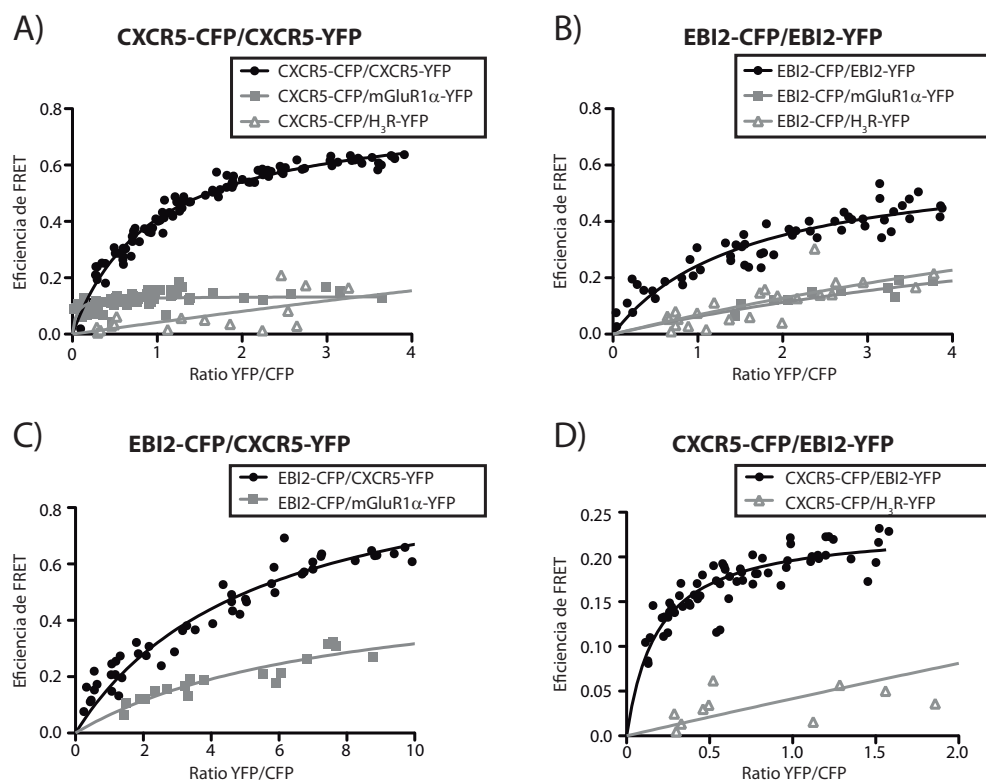


Figura 20: EBI2 y CXCR5 fusionados a la proteína fluorescente CFP mantienen su funcionalidad. Se realizaron ensayos de movilización de calcio en células HEK293T transfectadas transitoriamente con EBI2-CFP o CXCR5-CFP en respuesta a sus ligandos específicos, 7 α ,25-OHC (50 nM) y CXCL13 (50 nM) respectivamente.

CXCR5-CFP), y cantidades crecientes del receptor fusionado a la proteína aceptora (EBI2- o CXCR5-YFP). Detectamos FRET positivo tanto para los homodímeros CXCR5 y EBI2 como para los heterodímeros CXCR5/EBI2 (**Figura 21**). Como control de especificidad, utilizamos otros dos GPCRs de clase A (mGluR1 α -YFP y H₃R-YFP) observando que no hay transferencia de energía entre CXCR5-CFP o EBI2-CFP y los receptores control mGluR1 α -YFP o H₃R-YFP (**Figura 21**).

Tabla 5: Expresión de CXCR5

Tipo celular	Número de receptores CXCR5 por célula
Células transfectadas	13.851 \pm 985
Células B humanas	14.662 \pm 1.954



Dímeros	FRET _{max}	FRET ₅₀
CXCR5-CFP/CXCR5-YFP	0,798 ± 0,012	0,955 ± 0,039
EBI2-CFP/EBI2-YFP	0,627 ± 0,046	1,575 ± 0,277
EBI2-CFP/CXCR5-YFP	1,026 ± 0,034	5,320 ± 0,452
CXCR5-CFP/EBI2-YFP	0,233 ± 0,007	0,188 ± 0,022
CXCR5-CFP/mGluR1α-YFP	0,153 ± 0,007	ND
CXCR5-CFP/H3R-YFP	ND	ND
EBI2-CFP/mGluR1α-YFP	ND	ND
EBI2-CFP/H3R-YFP	ND	ND

Figura 21: CXCR5 y EBI2 forman homo- y heterodímeros. A, B) Para los homodímeros, obtuvimos las curvas de saturación de FRET a partir de células HEK293T transfectadas transitoriamente con cantidades constantes de CXCR5-CFP (1,5 µg; ~240.000 UF) o EBI2-CFP (1,5 µg; ~280.000 UF) y cantidades crecientes de CXCR5-YFP (~150000 - 1000000 UF) o EBI2-YFP (~650000 - 1200000 UF) o mGluR1α-YFP (~180.000 - 1.200.000 UF) o H₃R-YFP (~120.000 - 1.150.000 UF). C, D) Para los heterodímeros, las células HEK293T transfectadas con cantidades constantes de EBI2-CFP (1,5 µg; ~180.000 UF) o CXCR5-CFP (1,5 µg; ~600.000 UF) y cantidades crecientes de CXCR5-YFP (~31000 - 1700000 UF) o EBI2-YFP (~230000 - 1100000 UF) o mGluR1α-YFP (~180.000 - 1.200.000 UF) o H₃R (~120.000 - 1.150.000 UF). En la tabla los valores de FRET_{max} y FRET₅₀, representan la media ± SEM de al menos 6 experimentos, analizando los datos obtenidos con una ecuación de regresión no lineal aplicada a un modelo de un sitio de unión (UF: Unidades de fluorescencia, ND: No determinado).

Para confirmar estas interacciones y localizar donde se producen en la célula utilizamos también la técnica de FRET por el método de quemado del aceptor. Para ello cotransfecta-

mos las células HEK293T con los receptores fusionados a la proteína dadora y a la proteína aceptor utilizando las cantidades de YFP:CFP con las que obtuvimos la máxima eficiencia de

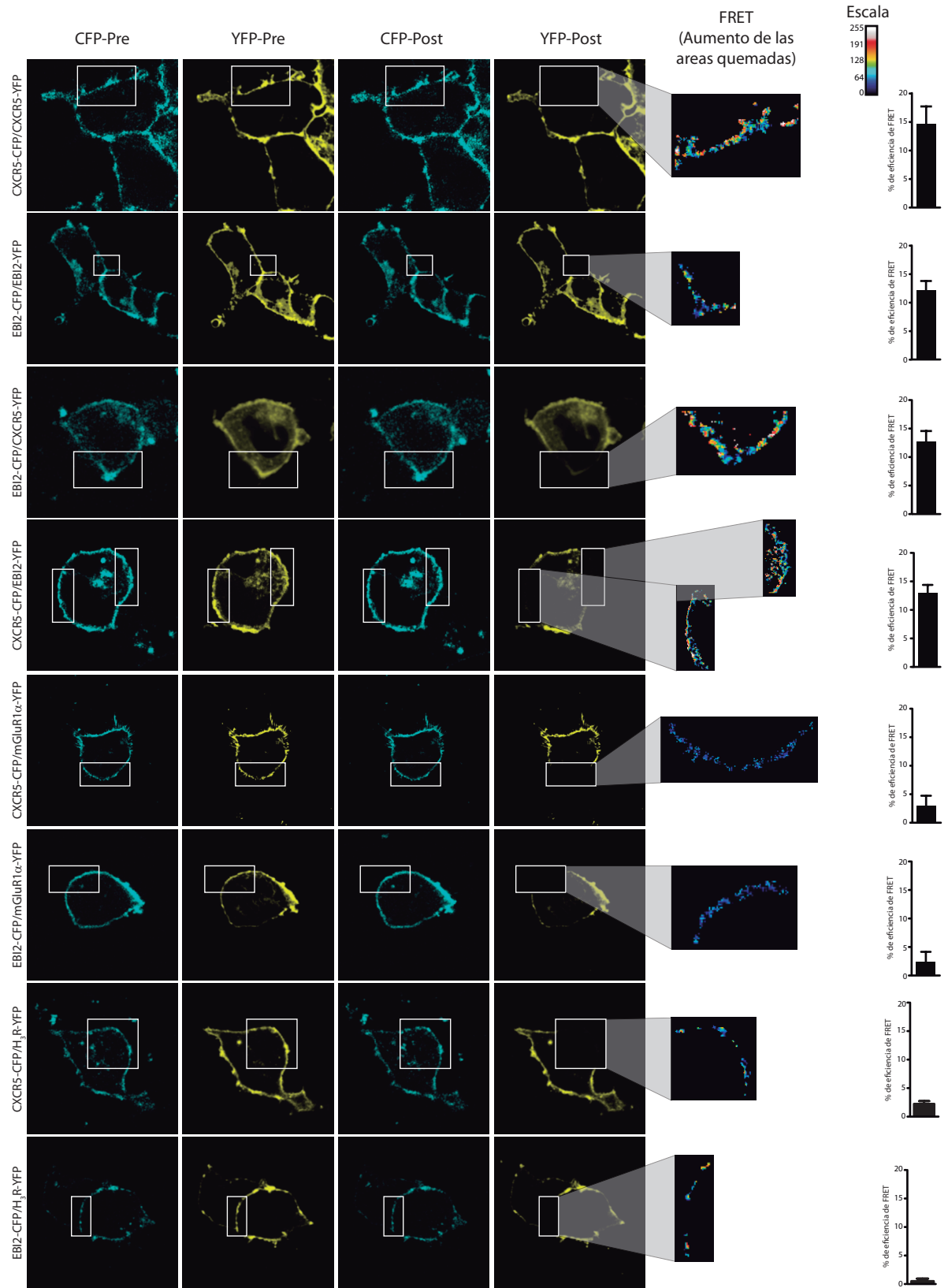


Figura 22: CXCR5 y EBI2 forman homo- y heterodímeros en la superficie celular. Imágenes representativas de CFP e YFP antes (CFP-Pre, YFP-Pre) y después (CFP-Post, YFP-Post) del quemado del aceptor, y aumento de las áreas quemadas (recuadrada con línea blanca), donde valoramos la eficiencia de FRET utilizando una escala de falsos colores. Cálculo de la media \pm SEM de la eficiencia de FRET de al menos 20 imágenes. Las áreas utilizadas para el análisis tienen un ratio YFP/CFP similar al ratio obtenido cuando se llega a la fase de saturación en las curvas de FRET (Figura 21); ratios YFP/CFP ($\sim 2/1$ para homodímeros y heterodímeros EBI2/CXCR5, y $1/1$ para los heterodímeros CXCR5/EBI2). Como control negativo utilizamos CXCR5-CFP/mGluR1 α -YFP, EBI2-CFP/mGluR1 α -YFP, CXCR5-CFP/H₃R-YFP y EBI2-CFP/H₃R-YFP.

FRET en las curvas de saturación. En primer lugar comprobamos el ratio de transfección YFP:CFP midiendo separadamente la fluorescencia de CFP y de YFP en cada célula. A continuación quemamos la proteína aceptora (YFP) observando un aumento de la intensidad de la CFP tanto en los homodímeros de CXCR5 y de EBI2 como en los heterodímeros CXCR5/EBI2, confirmando dichos complejos. En los controles EBI2-CFP/mGluR1 α -YFP, EBI2-CFP/H₃R-YFP, CXCR5-CFP/mGluR1 α -YFP y CXCR5-CFP/H₃R-YFP, detectamos una eficiencia de FRET residual demostrando la especificidad de las interacciones homo- y heterodiméricas (**Figura 22**).

Estos datos indican que CXCR5 y EBI2 forman tanto homo- como heterodímeros en ausencia de ligando y se localizan predominantemente en la superficie celular.

1.2.-La expresión de EBI2 modula los homodímeros de CXCR5

Recientemente se ha descrito la cooperación entre CXCR5 y EBI2 para el correcto posicionamiento de los linfocitos B en el folículo linfóide (Gatto et al, 2011). Teniendo estos datos en cuenta, y habiendo demostrado que tanto CXCR5 como EBI2 son capaces de formar homo- y heterodímeros, estudiamos el efecto de la coexpresión de EBI2 sobre los complejos homodiméricos de CXCR5.

Para ello transfectamos células HEK293T con HA-EBI2 o el vector vacío, y posteriormente cotransfectamos cantidades constantes de CXCR5-CFP y crecientes de CXCR5-YFP.

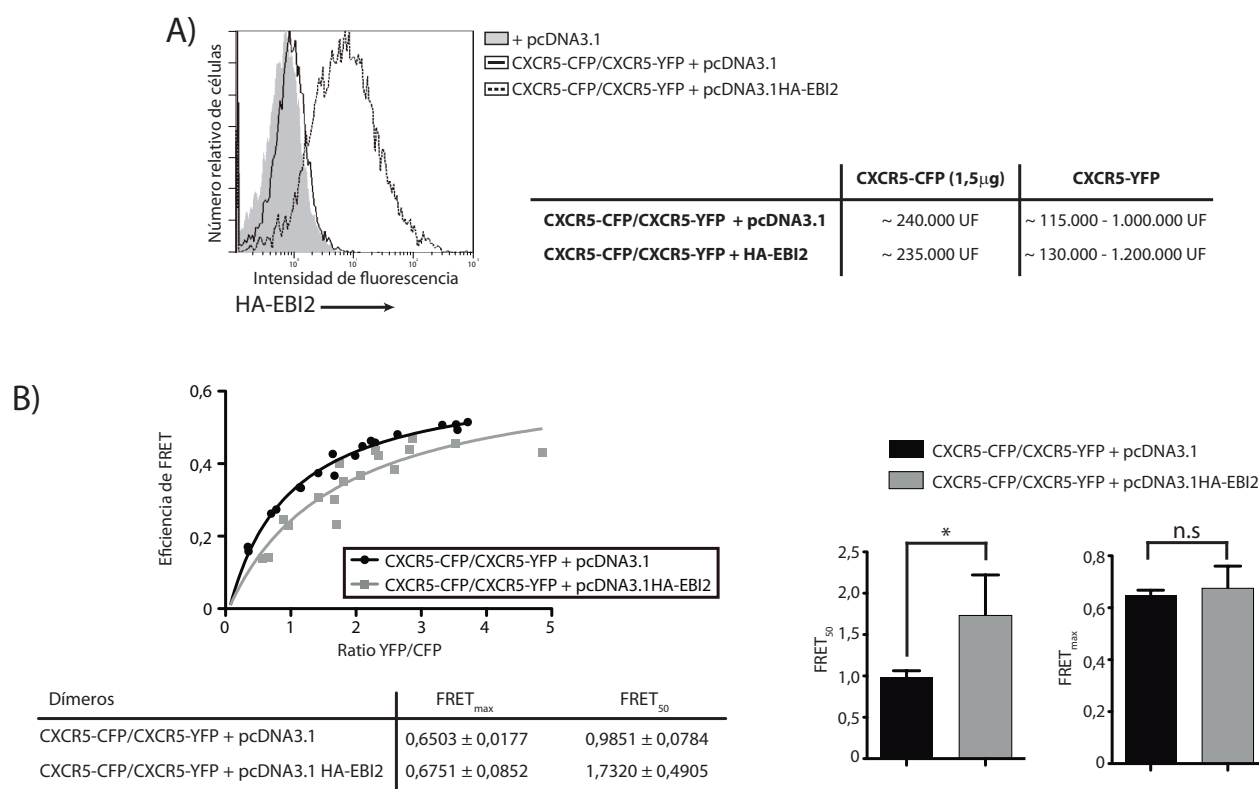


Figura 23: La expresión de EBI2 modula los complejos homodiméricos de CXCR5. A) Expresión de HA-EBI2 en la membrana de células HEK293T transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 o pcDNA3.1HA-EBI2 + CXCR5-CFP/CXCR5-YFP a ratio ~2. La expresión de HA-EBI2 mostrada se mantiene a los diferentes ratios de CXCR5-CFP/CXCR5-YFP. B) Células HEK293T transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 o pcDNA3.1HA-EBI2, se cotransfectaron 24 horas después con cantidades constantes de CXCR5-CFP y cantidades crecientes de CXCR5-YFP. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados. En las células que coexpresan CXCR5-CFP/CXCR5-YFP + HA-EBI2 los valores de FRET₅₀ aumentaron significativamente en los 4 experimentos en relación a las células que coexpresan CXCR5-CFP/CXCR5-YFP + pcDNA 3.1. Se representaron los valores de FRET_{max} y FRET₅₀ como la media \pm SEM.

El uso de HA-EBI2 permite seguir la presencia de EBI2 en la superficie celular ya que no existen anticuerpos comerciales que reconozcan EBI2, y demostrar que en presencia de este receptor los niveles de CXCR5 no se modifican (**Figura 23A**). Las curvas de saturación de FRET en estas condiciones demostraron que la expresión de HA-EBI2 modifica

significativamente la curva de saturación del homodímero de CXCR5 (**Figura 23B**), concretamente en el valor de $FRET_{50}$ ($0,9851 \pm 0,0784$ para CXCR5/CXCR5 en ausencia de HA-EBI2 y de $1,7320 \pm 0,4905$ para CXCR5/CXCR5 + HA-EBI2), lo que indica que la expresión de EBI2 promueve un cambio conformacional de los complejos homodiméricos de CXCR5.

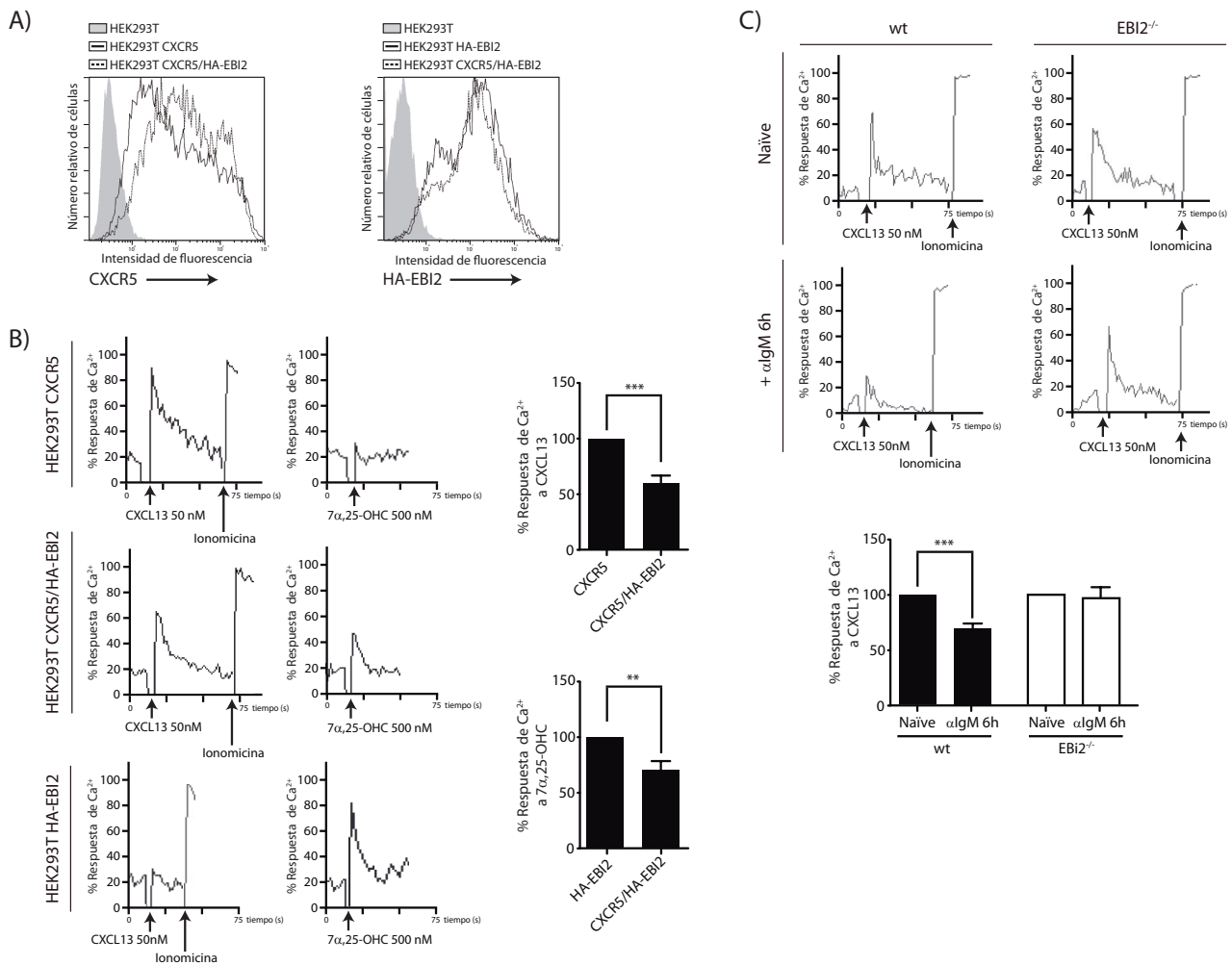


Figura 24: La coexpresión de EBI2 modula la movilización intracelular de calcio promovido por CXCL13.

A) Análisis por citometría de flujo de los niveles de CXCR5 (panel de la izquierda) o HA-EBI2 (panel de la derecha) en la membrana celular de células HEK293T transfectadas transitoriamente con CXCR5, HA-EBI2 o CXCR5/HA-EBI2. La coexpresión de uno de los receptores no afectó a los niveles del otro receptor. B) Ensayos de movilización de Ca^{2+} realizados en las células HEK293T analizadas en el panel A. Las células fueron estimuladas con CXCL13 (50 nM, panel de la izquierda) o con 7α,25-OHC (500 nM, panel de la derecha). La carga de las células con la sonda (Fluo3-AM) se comprobó estimulando con ionomicina. Mostramos un experimento representativo de 8 realizados y la cuantificación de la movilización de Ca^{2+} en respuesta a CXCL13 (50 nM) o a 7α,25-OHC (500 nM). Las células que coexpresan ambos receptores y son estimuladas con CXCL13 o 7α,25-OHC muestran una reducción significativa en la movilización de Ca^{2+} (** p < 0,01, *** p < 0,001). C) Ensayos de movilización de Ca^{2+} en células B naïve y activadas (anti-IgM 10 μg/ml, 6 h) wt (panel de la izquierda) y EBI2^{-/-} (panel de la derecha). Las células fueron estimuladas con CXCL13 (50 nM) o 7α,25-OHC (500 nM) y medidas por citometría de flujo. Se estimularon con ionomicina como control de carga de las células. Las gráficas muestran un experimento representativo de 4 realizados. La cuantificación de la respuesta en Ca^{2+} se calculó como el porcentaje de variación de la respuesta de Ca^{2+} con respecto a las células naïve (100 %). Media ± SEM (*** p < 0,001).

1.3.-EBI2 modula las funciones activadas vía CXCR5

1.3.1.-EBI2 modula la movilización intracelular de calcio promovida por CXCL13.

Para estudiar si los cambios conformacionales promovidos en los homodímeros CXCR5 por EBI2 tienen alguna consecuencia funcional utilizamos como sistema la línea celular HEK293T transfectada transitoriamente con CXCR5, HA-EBI2 o CXCR5/HA-EBI2, y comprobamos la movilización de calcio tras la activación con sus ligandos CXCL13 ó $7\alpha,25\text{-OHC}$.

Observamos que el pico de calcio promovido por CXCL13 en las células que sólo expresaban CXCR5 era significativamente menor cuando las células coexpresaban CXCR5/HA-EBI2 (**Figura 24B**). De igual modo sucedió al activar con $7\alpha,25\text{-OHC}$, que el pico de calcio fue significativamente menor cuando se coexpresaban ambos receptores (**Figura 24B**). Para poder comparar las respuestas entre las diferentes células transfectadas comprobamos la cantidad de carga de la sonda fluorescente estimulando a las células con ionomicina (**Figura 24B**). Como control de la especificidad de la movilización de calcio observada, estimu-

lamos las células que sólo expresan un receptor con el ligando del otro receptor, sin observar respuesta (**Figura 24B**). Confirmamos que la expresión de los receptores en las diferentes líneas celulares era similar (**Figura 24A**).

Posteriormente, confirmamos los datos obtenidos en la línea celular usando células B primarias de ratón, procedentes de ratones deficientes en EBI2 ($\text{EBI2}^{-/-}$) y ratones control (wt).

Después de cada purificación comprobamos la pureza de linfocitos B por citometría de flujo, teñiendo CD3 y B220. Obtuvimos tanto en linfocitos B wt como en $\text{EBI2}^{-/-}$ una pureza similar y superior al 95% (**Figura 25A**). Por otro lado, comprobamos por citometría de flujo que los linfocitos B purificados son naïve, para ello teñimos con CD69 y CD86 y observamos una ausencia de tinción de estos anticuerpos demostrando que tanto los linfocitos B wt como $\text{EBI2}^{-/-}$ no están activados (**Figura 25B**). Para comprobar que la deficiencia de EBI2 no afecta a la activación vía BCR, valoramos los niveles de CD69 y CD86 después de la activación (6 horas, αIgM 10 $\mu\text{g/ml}$), observando un aumento similar de estos niveles tanto en linfocitos B wt como $\text{EBI2}^{-/-}$ (**Figura 25B**). También comprobamos por RT-PCR el defecto de la expresión de EBI2 en los linfocitos B $\text{EBI2}^{-/-}$ (**Figura 25C**).

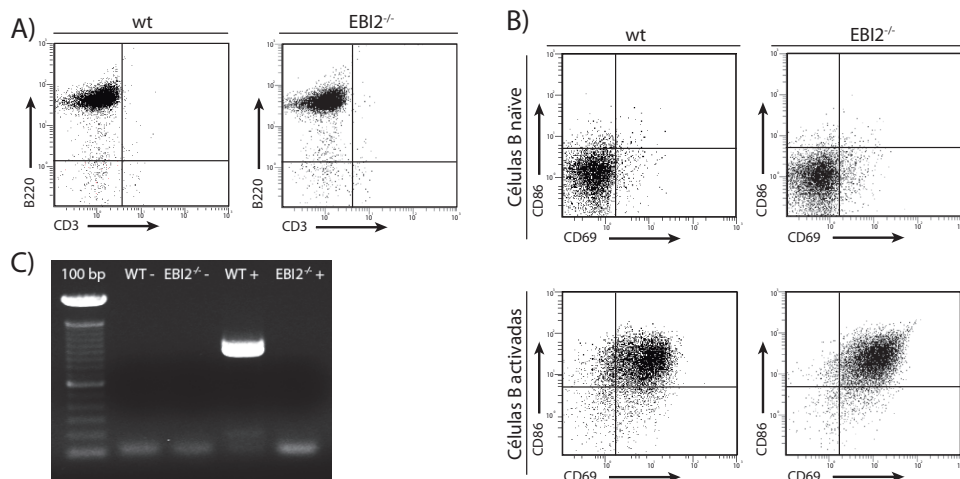


Figura 25: Análisis de la pureza y activación de los Linfocitos B wt y $\text{EBI2}^{-/-}$ con anti-IgM. A) Análisis por RT-PCR de la expresión de EBI2 en esplenocitos de ratones wt(+) y $\text{EBI2}^{-/-}$ (+). Como control de la RT-PCR, utilizamos la misma cantidad de ARN para obtener el ADNc que en las muestras, wt(+) y $\text{EBI2}^{-/-}$ (+), pero sin añadir la retrotranscriptasa. B) Las células B naïve fueron aisladas por selección negativa de bazo de ratones wt y $\text{EBI2}^{-/-}$, teñidas con anti-CD3 y -B220, y analizadas por citometría de flujo (95-98 % de pureza). C) Células B naïve y activadas (anti-IgM 10 $\mu\text{g/ml}$) procedentes de ratones wt y $\text{EBI2}^{-/-}$ fueron teñidas con anti-CD69 y -CD86, y analizadas por citometría de flujo.

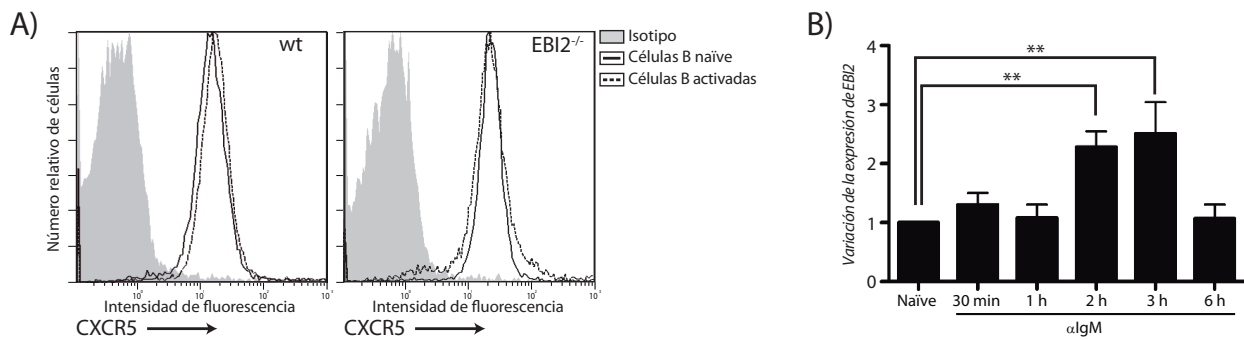


Figura 26: Análisis de los niveles de CXCR5 y EBI2 en células B wt y EBI2^{-/-} tras la activación. A) Expresión de CXCR5 en la membrana celular de células B wt (panel de la izquierda) y EBI2^{-/-} (panel de la derecha) antes y después de la activación (anti-IgM 10 µg/ml, 6 h). B) Análisis por PCR cuantitativa de la expresión de EBI2 en células B wt tras la activación (anti-IgM 10 µg/ml). Se muestra un aumento significativo de la expresión de EBI2 observado 2-3 horas después de la activación (** p < 0,01).

Los niveles de CXCR5 en la superficie celular son similares en linfocitos B wt y EBI2^{-/-}, sin activar y activados (6 horas, αIgM 10 µg/ml) (**Figura 26A**). Por otro lado la activación provoca un aumento en la expresión de EBI2 en los linfocitos wt, que detectamos por RT-qPCR ya que no disponemos de anticuerpos específicos para citometría de flujo (**Figura 26B**). La activación de los linfocitos B wt produce un aumento relativamente rápido (2-3 horas) de la expresión de EBI2 sin alterar los niveles de CXCR5.

La estimulación con CXCL13 provocó un flujo de calcio en las células B naïve bastante mayor que en las células B activadas a pesar de que los niveles de CXCR5 son similares (**Figura 24C**). Sin embargo el efecto no se detectó en células B naïve y activadas deficientes en EBI2 (**Figura 24C**).

1.3.2.-EBI2 modula a la activación de las MAPK en respuesta a CXCL13.

Se ha descrito que la estimulación de linfocitos B con CXCL13 activa la ruta de las MAPK (Burkle et al, 2007). Estudiamos entonces el efecto que tiene la coexpresión de EBI2 en la activación de ERK1,2 en respuesta a CXCL13. Células HEK293T transfectadas transitoriamente con CXCR5 o CXCR5/HA-EBI2 fueron estimuladas con CXCL13, y determinamos la fosforilación de ERK1,2 me-

dante “western blot” con anticuerpos específicos. La presencia de HA-EBI2 produjo una menor activación de ERK1,2 (**Figura 27A**). Para analizar si este efecto es específico de EBI2, quisimos reducir los niveles de expresión de este receptor en las células que coexpresaban CXCR5/EBI2. Para valorar los niveles de expresión de ambos receptores tras la estimulación con sus ligandos realizamos ensayos de internalización. Utilizamos células HEK293T transfectadas transitoriamente con CXCR5, HA-EBI2 o CXCR5/HA-EBI2. En primer lugar estimulamos las células con 7α,25-OHC, observando que la internalización de HA-EBI2 era similar en las células que expresaban sólo HA-EBI2 o CXCR5/HA-EBI2 (~40% a los 30 min), mientras que los niveles de CXCR5 se mantuvieron constantes (**Figura 27B,C**). Valoramos también el efecto de CXCL13 y observamos que promovió la misma internalización de CXCR5 independientemente de que la célula coexpresara o no HA-EBI2 (**Figura 27D,E**), y de la misma manera no se vieron afectados los niveles de HA-EBI2 en la membrana celular. Pretratamos entonces las células que coexpresaban CXCR5/HA-EBI2, con 7α,25-OHC durante 30 minutos a 37 °C, y estimulamos después con CXCL13 (100 nM). Observamos una mayor fosforilación de ERK1,2, indicando una recuperación en la activación de estas MAPK, en función de la reducción de los niveles de EBI2 en la membrana (**Figura 27A**).

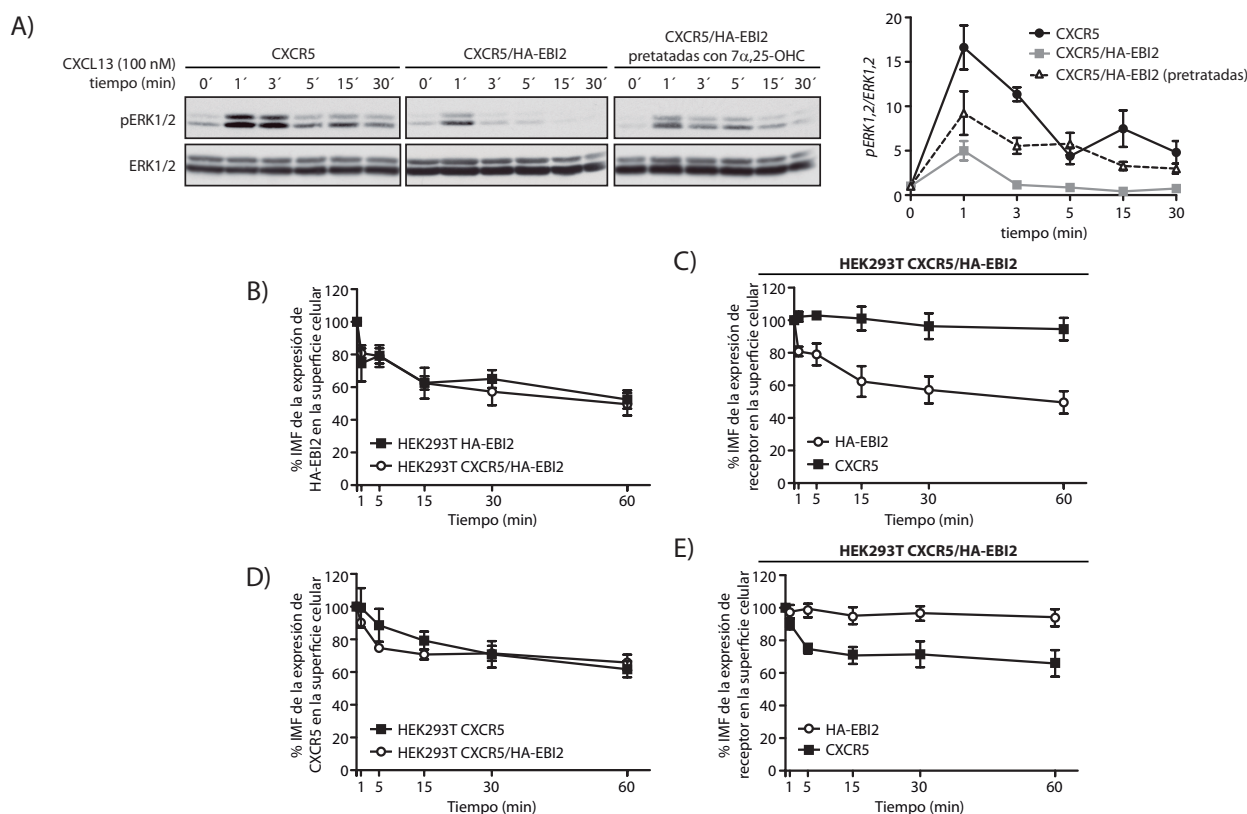


Figura 27: EBI2 modula la activación de ERK1,2 en respuesta a CXCL13. A) Panel izquierda: Células HEK293T CXCR5, o CXCR5/HA-EBI2 sin tratar o pretratadas con $7\alpha,25\text{-OHC}$ (500 nM, 30 min), fueron estimuladas con CXCL13 (100 nM), y los lisados celulares obtenidos fueron analizados por western blot utilizando anticuerpos anti-pERK1,2. Como control de carga se utilizó anti-ERK1/2. Panel derecha: Densitometría de la fosforilación de ERK1,2 tras la estimulación con CXCL13 (100 nM). B, C, D, E) Análisis de la expresión de HA-EBI2 y CXCR5 en la membrana plasmática en células HEK293T CXCR5, HA-EBI2 y CXCR5/HA-EBI2 estimuladas con (B,C) $7\alpha,25\text{-OHC}$ (500 nM) o (D,E) CXCL13 (50 nM). Media \pm SEM de 5 experimentos.

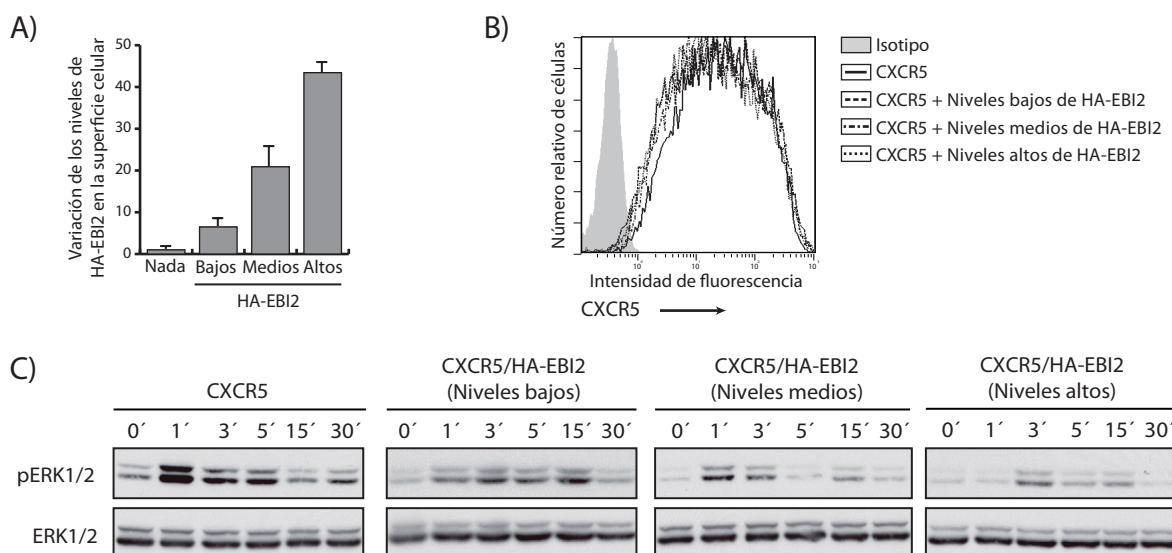


Figura 28: El aumento de los niveles de EBI2 reduce la activación de ERK1,2 promovida por CXCL13. A, B) Células HEK293T fueron transfectadas con una cantidad fija de CXCR5 (12 $\mu\text{g}/10 \times 10^6$ células) y diferentes cantidades de HA-EBI2 (3-18 $\mu\text{g}/10 \times 10^6$ células). Determinamos mediante citometría de flujo la expresión de ambos receptores. A) Los niveles de HA-EBI2 se muestran como la media \pm SEM de la variación de la intensidad de fluorescencia. B) Se muestra un experimento representativo de los niveles de CXCR5. C) Las células transfectadas fueron estimuladas con CXCL13 (100 nM), y los lisados celulares obtenidos fueron analizados por western blot utilizando anti-pERK1,2. Como control de carga se utilizó anti-ERK1,2.

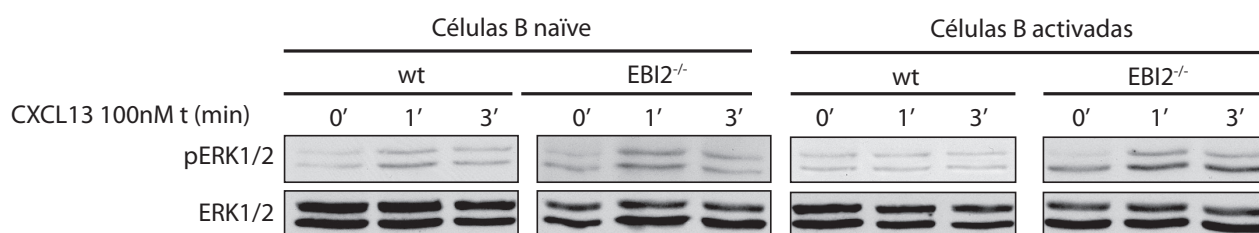


Figura 29: La activación de células B wt, pero no EBI2^{-/-}, reduce la activación de pERK1/2 promovida por CXCL13. Lisados de células B wt y EBI2^{-/-}, naïve y activadas con anti-IgM (10 µg/ml, 6 h), estimuladas con CXCL13 (100 nM), fueron analizados por western blot utilizando anti-pERK1/2. Como control de carga se utilizó anti-ERK1,2.

Para confirmar este efecto transfectamos HEK293T con CXCR5 y con distintas concentraciones de HA-EBI2, y tras comprobar por citometría de flujo como los niveles de CXCR5 no variaban (**Figura 28B**), pero sí aumentaban los niveles de HA-EBI2 (**Figura 28A**), las cinéticas de activación de ERK1,2 en respuesta a CXCL13 correlacionaron inversamente con los niveles de EBI2 (**Figura 28C**).

Finalmente realizamos el mismo experimento en células B primarias de ratón, observando que tras su activación con anti-IgM y aumento de los niveles de EBI2, la activación de ERK1,2 por CXCL13 disminuía, mientras que el efecto no se produjo al activar células B deficientes en EBI2 (**Figura 29**).

1.3.3.-EBI2 reduce la migración en respuesta a CXCL13.

La activación de MAPK se ha relacionado con procesos de migración, estudiamos entonces el efecto funcional del aumento de expresión de EBI2, en la migración de células B mediada por CXCL13. Observamos una migración similar de linfocitos B naïve wt y EBI2^{-/-} (**Figura 30A**). Sin embargo, tras la activación, observamos una reducción significativa

en la migración en respuesta a CXCL13 en linfocitos B wt, que no ocurría cuando las células B activadas eran EBI2^{-/-} (**Figura 30A**). Como control, la migración en respuesta a CXCL12 de células B wt y EBI2^{-/-} activadas fue similar (**Figura 30B**).

Esta nueva serie de resultados demuestra que tanto en líneas celulares como en células primarias, la expresión de EBI2 reduce la respuesta funcional de CXCR5 a CXCL13.

1.4.-EBI2 no afecta los procesos de desensibilización de CXCR5

Una posible explicación a la reducción observada en las respuestas mediadas por CXCR5 tras la coexpresión de EBI2, es que ocurran procesos de desensibilización heteróloga, esto es que el estímulo de un determinado receptor reduzca la señalización desencadenada por el estímulo sobre otro receptor. Para descartar este proceso, analizamos la capacidad de CXCL13 y 7 α ,25-OHC para movilizar calcio en células HEK293T cotransfectadas transitoriamente con CXCR5/HA-EBI2. La respuesta específica a CXCL13 no se veía afectada por

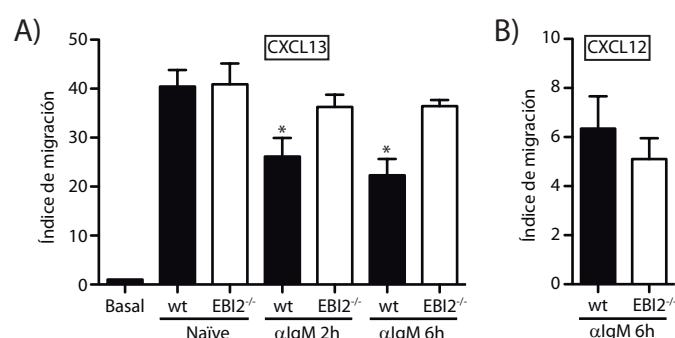


Figura 30: La activación de las células B wt, pero no EBI2^{-/-}, reduce la migración en respuesta a CXCL13. A) Migración promovida por CXCL13 (300 nM) en células B wt y EBI2^{-/-}, naïve y activadas con anti-IgM (10 µg/ml, 2 y 6 h). B) Como control, migración en respuesta a CXCL12 (50 nM) en células B wt y EBI2^{-/-} activadas con anti-IgM (10 µg/ml, 6h). Media \pm SEM de al menos 6 experimentos. La migración basal es la migración promovida en las células por el medio sin quimioquina.

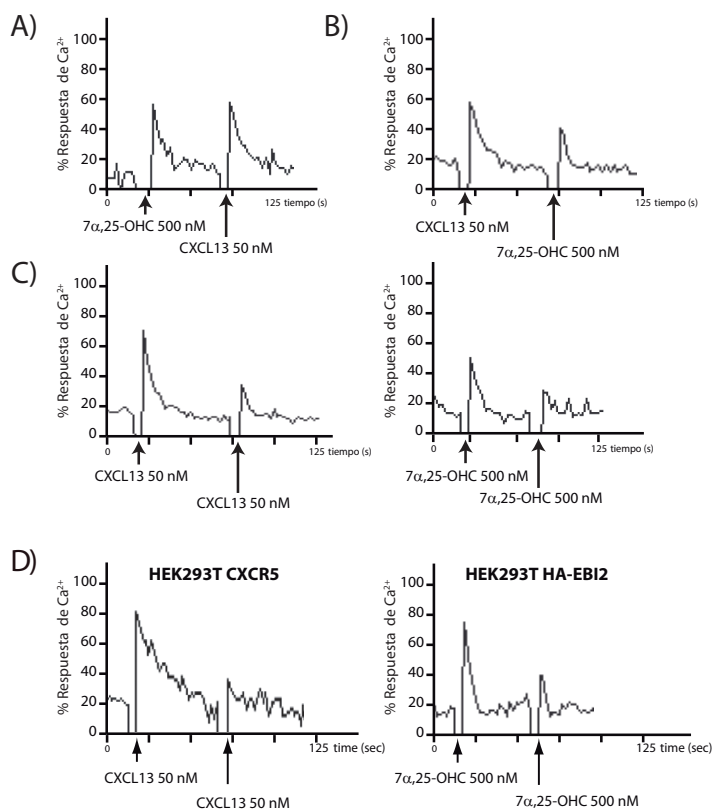


Figura 31: La coexpresión de HA-EBI2 no promueve desensibilización heteróloga de CXCR5 y “viceversa”. A, B) Evaluamos la desensibilización heteróloga con ensayos de movilización de Ca^{2+} intracelular en células HEK293T CXCR5/HA-EBI2. Se cargaron las células con la sonda (Fluo3-AM) y se estimuló con A) $7\alpha,25\text{-OHC}$ (500 nM) seguido de CXCL13 (50 nM) y B) “viceversa”. C, D) Desensibilización homóloga estimulando repetidamente células HEK293T C) CXCR5/HA-EBI2 o D) CXCR5 o HA-EBI2 con el mismo ligando, CXCL13 (50 nM, panel de la izquierda) o $7\alpha,25\text{-OHC}$ (500 nM, panel de la derecha). Experimento representativo de la menos 4 realizados (triplicados).

la estimulación previa con $7\alpha,25\text{-OHC}$ (**Figura 31A**), ni tampoco sucedió al activar primero CXCR5 y evaluar luego la respuesta vía EBI2 (**Figura 31B**).

Estos datos indican que no existe desensibilización heteróloga entre CXCR5 y EBI2 en respuesta a sus ligandos.

Como control estudiamos los fenómenos de desensibilización homóloga. Estos fenómenos se dan en los receptores de quimioquinas,

y consisten en la reducción de la respuesta tras la estimulación repetida de un receptor con el mismo ligando. Utilizamos HEK293T cotransfectadas con CXCR5/HA-EBI2, y observamos en ambos casos (CXCL13 y $7\alpha,25\text{-OHC}$) una reducción de la respuesta cuando repetimos la estimulación con el mismo ligando (**Figura 31C**). Comprobamos también que este fenómeno se produce de la misma manera en células que sólo expresan CXCR5 o HA-EBI2 (**Figura 31D**). Demostrando de esta manera la existencia de los fenómenos de desensibilización homóloga para CXCR5 y EBI2.

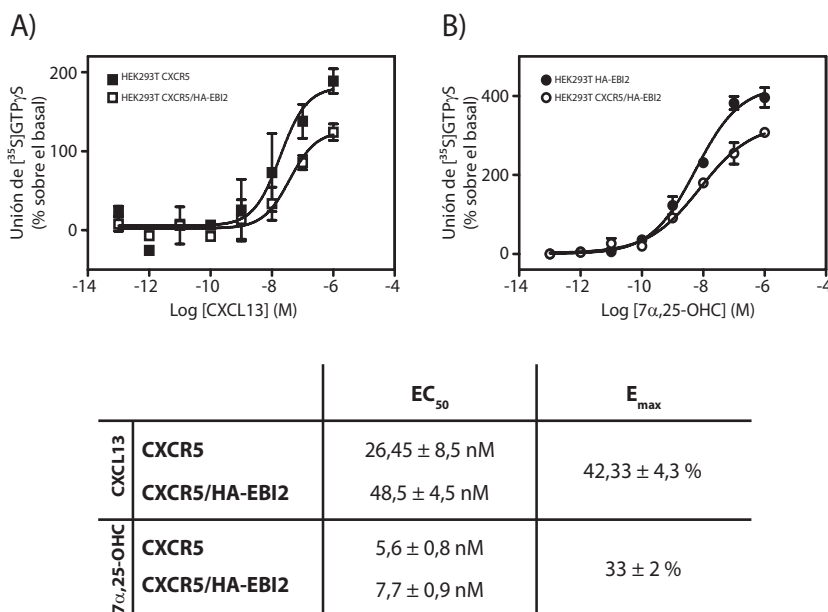


Figura 32: Efecto de la coexpresión de HA-EBI2 en la unión de $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ promovida por CXCL13 en membranas celulares de HEK293T CXCR5/HA-EBI2 y “viceversa”. A) Unión de $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ promovida por CXCL13 (1pM-1μM) en membranas de células HEK293T CXCR5 o CXCR5/HA-EBI2. B) Unión de $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ promovida por $7\alpha,25\text{-OHC}$ (1pM-1μM) en membranas de células HEK293T HA-EBI2 o CXCR5/HA-EBI2. La unión no específica fue determinada analizando la unión de $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ en presencia de 10 μM de GTPγS no marcado. Medias \pm SEM de al menos 3 experimentos (triplicados).

1.5.-EBI2 disminuye la activación de la proteína G en respuesta a CXCL13

Decidimos entonces evaluar si el cambio conformacional que detectamos en CXCR5 al coexpresar EBI2 afectaba a la capacidad de CXCL13 para activar la proteína G. Para ello realizamos ensayos de activación de proteína G utilizando marcaje de ^{35}S en el fosfato gamma del GTP, lo que nos permite valorar la cantidad de GTP radiactivo que se une a $\text{G}\alpha\text{i}$.

Membranas de células HEK293T co-transfectadas transitoriamente con CXCR5, HA-EBI2 y CXCR5/HA-EBI2 fueron activadas con diferentes concentraciones de CXCL13 o de $7\alpha,25\text{-OHC}$, y la unión de ^{35}S - γGTP evaluada. La respuesta a CXCL13 en células que coexpresan CXCR5/HA-EBI2 aumentó la EC_{50} de $26,45 \pm 8,5 \text{ nM}$ (HEK293T CXCR5) a $48,5 \pm 4,5 \text{ nM}$ (HEK293T CXCR5/HA-EBI2), mientras que redujo significativamente la máxima unión (E_{max}) (**Figura 32A**). Observamos el mismo efecto cuando estimulamos las células, que coexpresan los dos receptores con $7\alpha,25\text{-OHC}$, es decir, las células que coexpresan CXCR5/HA-EBI2 en respuesta a sus ligandos promueven una menor activación de la proteína G (**Figura 32B**).

1.6.-EBI2 modula la afinidad de CXCL13 por CXCR5

Los efectos de la reducción en la función vía CXCR5 y en la activación de la proteína G observados al coexpresar EBI2, son compatibles con que el cambio conformacional del CXCR5 afectase a la unión de su ligando. Para

valorar la afinidad de la quimioquina a su receptor, y dado que el marcaje de las quimioquinas modifica su capacidad de unión al receptor y que la solubilización del receptor altera su estructura, utilizamos un método recientemente descrito basado en la incorporación del receptor en partículas lentivirales y su posterior depósito en un biosensor (Vega et al, 2011).

Para la generación de las partículas lentivirales transfectamos previamente las células HEK293T con CXCR5, HA-EBI2 o CXCR5/HA-EBI2. Posteriormente esas mismas células son cotransfectadas con los plásmidos que generarán las partículas lentivirales (pLVTHM/GFP, psPAX2 y pCMV-VSVG, que contienen proteínas de la envuelta y proteínas de la cápside). Al salir, las partículas virales de la célula huésped se llevan parte de la membrana celular, así como las proteínas embebidas en ella, incluidos los receptores previamente coexpresados.

Una vez generadas las partículas lentivirales, y tituladas, procedimos a caracterizar los niveles de CXCR5 de las mismas. Dado el pequeño tamaño que poseen las partículas lentivirales, ya que escapan de la detección por citometría de flujo, por lo que fueron acopladas a bolas de látex que les confiere un tamaño y complejidad suficiente para poder ser analizadas. En estas condiciones, valoramos los niveles de CXCR5 en las diferentes partículas lentivirales generadas utilizando anticuerpos específicos y citometría de flujo, y observamos los mismos niveles de CXCR5 en las partículas CXCR5 y CXCR5/HA-EBI2 (**Figura 33A**). Como control negativo utilizamos las partículas lentivirales que solo llevaban HA-EBI2

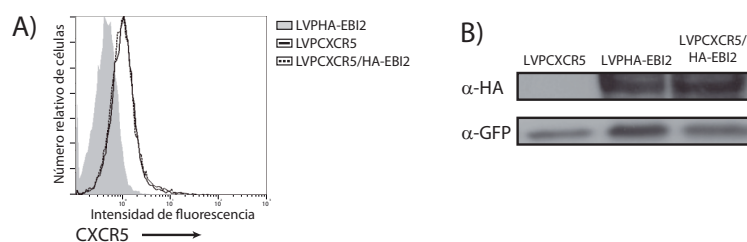


Figura 33: Caracterización de las partículas lentivirales generadas. A) Los niveles de expresión de CXCR5 fueron analizados por citometría de flujo en partículas lentivirales (LVP), LVPCXCR5, LVPHA-EBI2 y LVPCXCR5/HA-EBI2, unidas a bolas de latex ($4 \mu\text{m}$). B) La expresión de HA-EBI2 fue analizada por western blot en partículas LVPCXCR5, LVPHA-EBI2 y LVPCXCR5/HA-EBI2 con anti-HA. Como control de carga se utilizó anti-GFP.

(Figura 33A). Dada la carencia de anticuerpos anti-EBI2 para citometría de flujo, la presencia de HA-EBI2 fue detectada por western blot con anti HA, utilizando la GFP como control de carga (Figura 33B).

Inmovilizamos las partículas lentivirales obtenidas en la superficie de los canales del chip (CM5) del biosensor e inyectamos soluciones de CXCL13 (de 100 a 400 nM), por los canales del chip. Se empieza a unir el ligando y observamos una fase de asociación (aumento señal) que llegará a saturación (señal estable, 440 RU para 400 nM y 25 RU para 100 nM). En ese momento, alcanzado el equilibrio de asociación/disociación paramos de pasar ligando y empezamos a pasar PBS por los canales del chip, por lo que empieza a disociarse el ligando y observamos la fase de disociación (disminución de la señal) (Figura 34A). A partir de los datos obtenidos de la fase de asociación y de la fase de disociación, calculamos ajustando las

curvas a un modelo de unión tipo Langmuir (1:1), mediante el programa Biaevaluation 4.1 de Biacore, la constante de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}) respectivamente. Finalmente a partir de estos datos calculamos la constante de afinidad (KD). Observamos que las partículas lentivirales que poseen ambos receptores (CXCR5/HA-EBI2) presentan una constante de asociación menor y una constante de disociación mayor que las que sólo poseen CXCR5 (Figura 34B), lo que se traduce en una menor afinidad de CXCL13 por CXCR5 cuando EBI2 se coexpresa (Figura 34B). Utilizamos como control las partículas lentivirales que solo llevan HA-EBI2, y en estas partículas no observamos unión específica de CXCL13.

Por tanto estos datos demuestran que la presencia de EBI2 disminuye la afinidad de CXCL13 por CXCR5, lo que justifica los efectos observados anteriormente.

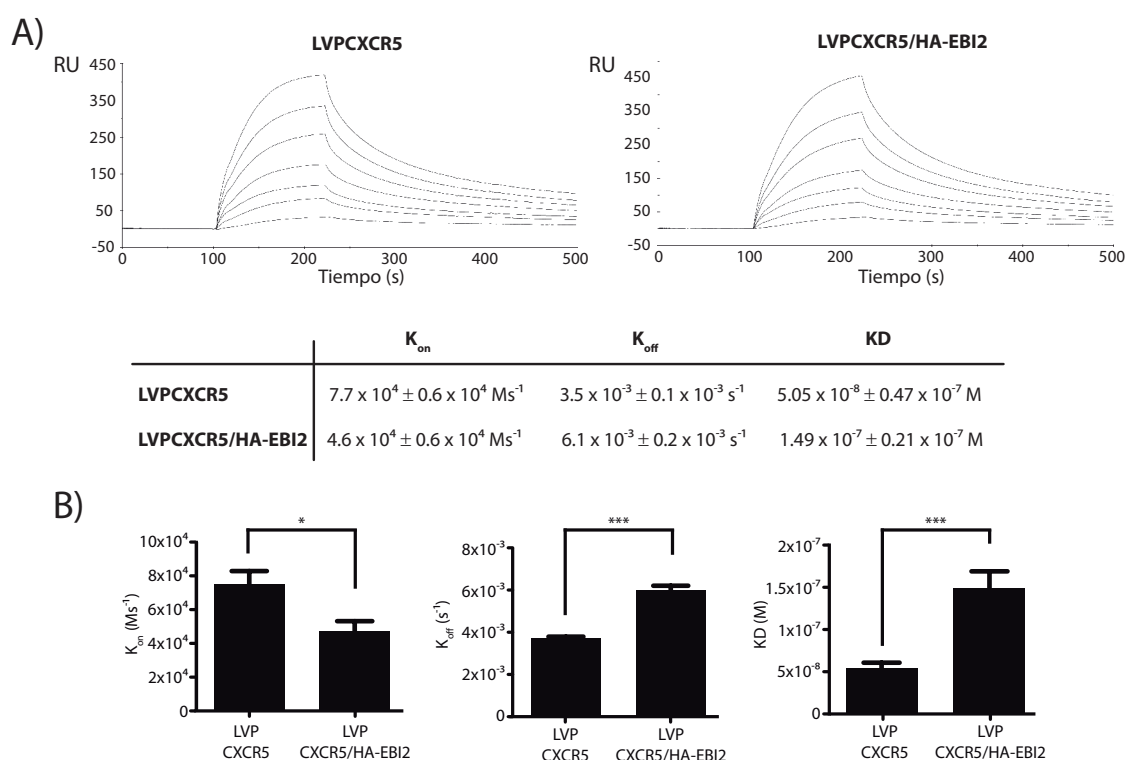


Figura 34: La coexpresión de HA-EBI2 modula la afinidad de CXCL13 por CXCR5. A) Sensorgramas de la unión de CXCL13 (100-400 nM) a partículas lentivirales LVPCXCR5 (panel de la izquierda) o LVPCXCR5/HA-EBI2 (panel de la derecha), inmovilizadas en la superficie del chip. Las alícuotas de las distintas concentraciones de CXCL13 (100-400 nM) fueron inyectadas secuencialmente, y la unión se monitorizó en el sensorgrama como el aumento de RU. Se restaron los canales de referencia a la unión de CXCL13 obtenida para las partículas LVP-CXCR5 y LVPCXCR5/HA-EBI2. Panel inferior: Tabla de las constantes de asociación (K_{on}), disociación (K_{off}) y afinidad (KD) obtenidas para la unión de CXCL13 a las partículas LVPCXCR5 y LVPCXCR5/HA-EBI2. B) K_{on} , K_{off} y KD fueron alteradas significativamente en las partículas LVPCXCR5/HA-EBI2 en comparación con las partículas LVPCXCR5. Media \pm SEM de 3 experimentos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

2.-Estudio de la relevancia funcional de la expresión de CCR5 en células CD4⁺/CXCR4⁺ sobre la infección por cepas X4 del VIH-1

2.1.-CD4, CXCR4 y CCR5 forman heterocomplejos en la superficie celular

Como ya se ha descrito, el VIH-1 utiliza CD4 y dos co-receptores principales, CCR5 y CXCR4. Se ha descrito la interacción entre CXCR4 y CCR5 (Sohy et al, 2009) y además, se conoce que la gp120 promueve la asociación de CD4 con CXCR4 o con CCR5 (Barrero-Villar et al, 2009; Basmaciogullari et al, 2006; Lapham et al, 1999). Estudiamos mediante técnicas de transferencia de energía las posibles interacciones entre CD4, CXCR4 y CCR5, y si estas interacciones podrán ser moduladas por los niveles de expresión de cada una de las proteínas.

2.1.1-CD4 interacciona con CXCR4 y con CCR5

En primer lugar fusionamos en el extremo C-terminal de cada receptor: CD4 a la luciferasa (CD4-Rluc), CXCR4 a CFP (CXCR4-CFP) y CCR5 a YFP (CCR5-YFP), y comprobamos que estas proteínas (quiméricas o de fusión) mantenían su funcionalidad (**Figura 35A,B**).

Además comprobamos que los niveles de los receptores en células transfectadas eran similares a los encontrados en linfocitos T CD4⁺ humanos (**Tabla 7**), indicando que los niveles de expresión en estas células son similares a los fisiológicos.

Tabla 7: Expresión de CD4

Tipo celular	Número de receptores CD4 por célula
Células transfectadas	13.828 ± 3.686
Células T CD4 ⁺ humanas	252.151 ± 3.315

Para la realización de los ensayos de BRET transfectamos concentraciones constantes de la proteína CD4-Rluc (dadora), y concentraciones crecientes de las proteínas aceptoras CXCR4-CFP (BRET²) o CCR5-YFP (BRET¹). Como control negativo utilizamos el 5-HT_{2B} fusionado a luciferasa (Rluc) y CXCR4-CFP (BRET²) o CCR5-YFP (BRET¹). Tanto en CD4-Rluc/CXCR4-CFP como en CD4-Rluc/CCR5-YFP detectamos curvas de BRET positivas, indicando que estos receptores interaccionan. Como control de especificidad no se detectó BRET positivo al usar 5-HT_{2B}-Rluc con CXCR4-CFP o con CCR5-YFP (**Figura 36A,B**).

Estos datos confirman la existencia de los complejos CD4/CXCR4 y CD4/CCR5 en ausencia de ligandos (Basmaciogullari et al, 2006; Lapham et al, 1999).

2.1.2- CXCR4 y CCR5 forman heterodímeros

A pesar de estar descrito en la bibliografía que CXCR4 y CCR5 forman complejos heterodiméricos, confirmamos estos datos mediante las curvas de saturación de FRET. Observamos que efectivamente existe interacción entre ambos receptores, y que además es específica, ya que la interacción con otro GPCR clase A (mGluR1α) fue negativa (**Figura 37**). Utilizando la técnica del quemado del aceptor, identificamos que estos complejos heterodiméricos se localizan principalmente en la membrana celular (**Figura 38**).

Otra técnica alternativa que nos permitió corroborar estos resultados es la de Fluorescencia bimolecular de complementación (BiFC) (Kerppola, 2006). Esta técnica nos permite detectar fluorescencia a partir de dos fragmentos no fluorescentes de la proteína YFP (en nuestro caso), si existe interacción entre ambos. Fusionamos cada mitad de la proteína YFP (nYFP, cYFP) a un receptor, pudiendo determinar la existencia de complejos diméricos por la detección de fluorescencia.

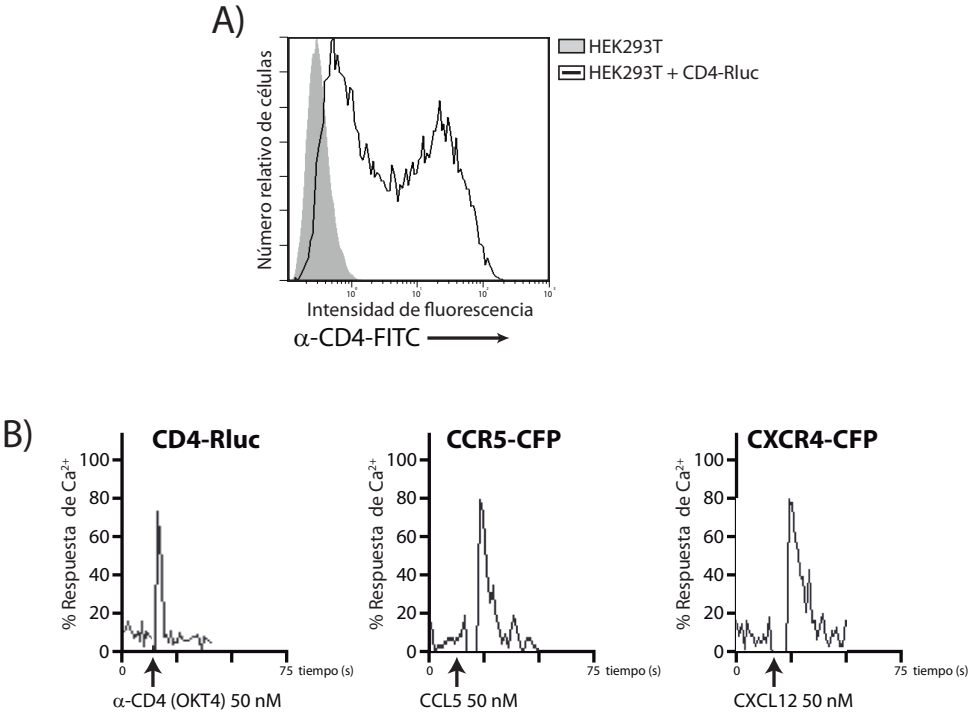


Figura 35: CD4, CCR5 y CXCR4 mantienen su funcionalidad fusionados a la luciferasa o a la proteína fluorescente CFP. A) Análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana de CD4 en células HEK293T transfectadas transitoriamente con CD4-Rluc. B) Ensayos de movilización de Ca^{2+} en células HEK293T transfectadas transitoriamente con CD4-Rluc, CCR5-CFP o CXCR4-CFP, y estimuladas con sus ligandos específicos, anti-CD4 (OKT4, 50 nM), CCL5 (50 nM) y CXCL12 (50 nM) respectivamente. Experimento representativo de tres realizados.

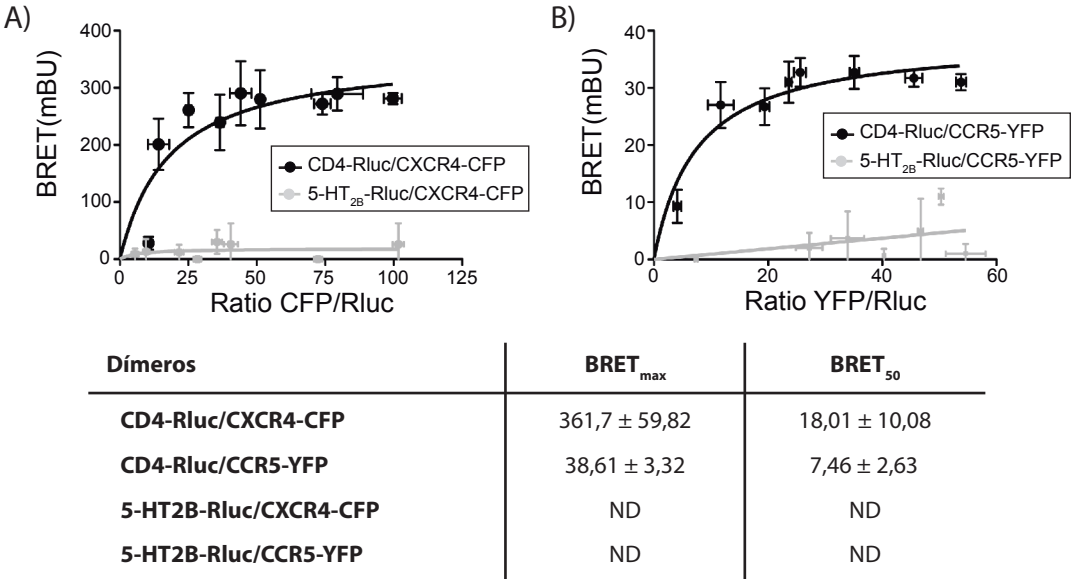


Figura 36: CD4 forma heterodímeros con CXCR4 y CCR5. A, B) Curvas de BRET fueron realizadas utilizando HEK293T transfectadas transitoriamente con CD4-Rluc (~50.000 UL) y A) CXCR4-CFP (~3.000-5.000 UF) o B) CCR5-YFP (~4.000-30.000 UF). Como control negativo, se utilizó el 5-HT_{2B}-Rluc (0,5 μ g; ~50.000 UL). En la tabla los valores de BRET_{max} y BRET₅₀, representan la media \pm SEM de al menos 6 experimentos, analizando los datos obtenidos con una ecuación de regresión no lineal aplicada a un modelo de un sitio de unión (UL: Unidades de luminiscencia, UF: Unidades de fluorescencia, ND: No determinado).

Para realizar estos experimentos, en primer lugar fusionamos la parte C-terminal de la YFP (cYFP) al extremo C-terminal de CXCR4 (CXCR4-cYFP), mientras que la parte N-terminal de la YFP (nYFP) la fusionamos al extremo C-terminal de CCR5 (CCR5-nYFP). Como demuestra su comportamiento en ensayos de movilización de calcio, las proteínas de fusión son perfectamente funcionales (**Figura 39**). Transfectamos células HEK293T con CXCR4-cYFP y con CCR5-nYFP, y observamos fluorescencia de YFP indicando la interacción específica entre estos dos receptores. Como control, no observamos señal en células transfectadas con: cYFP/nYFP, CXCR4-cYFP/nYFP o cYFP/CCR5-nYFP (**Figura 40**).

Estos datos confirman la heterodimerización de CXCR4/CCR5 en ausencia de ligandos.

2.1.3- CD4, CXCR4 y CCR5 forman heterotrímeros

Visto que CD4 forma heterodímeros con CXCR4 y CCR5, y también que CXCR4 y CCR5 forman homo- y heterodímeros, decidimos evaluar si CD4, CXCR4 y CCR5 pueden formar heterotrímeros cuando se coexpresan.

Para ello utilizamos la técnica de BRET-BiFC. Cotransfectamos las células HEK293T con cantidades constantes de la proteína fusionada a la molécula dadora (CD4-Rluc) y cantidades crecientes de las proteínas fusionadas a los 2 fragmentos de la proteína aceptora (CXCR4-cYFP y CCR5-nYFP respectivamente) en un ratio 1:1. La adición del sustrato para luciferasa (Coelenterazina H) excitó la emisión de la YFP y ésta fue detectada ya que las dos mitades de la YFP estaban interaccionando como consecuencia de la interacción CXCR4/CCR5.

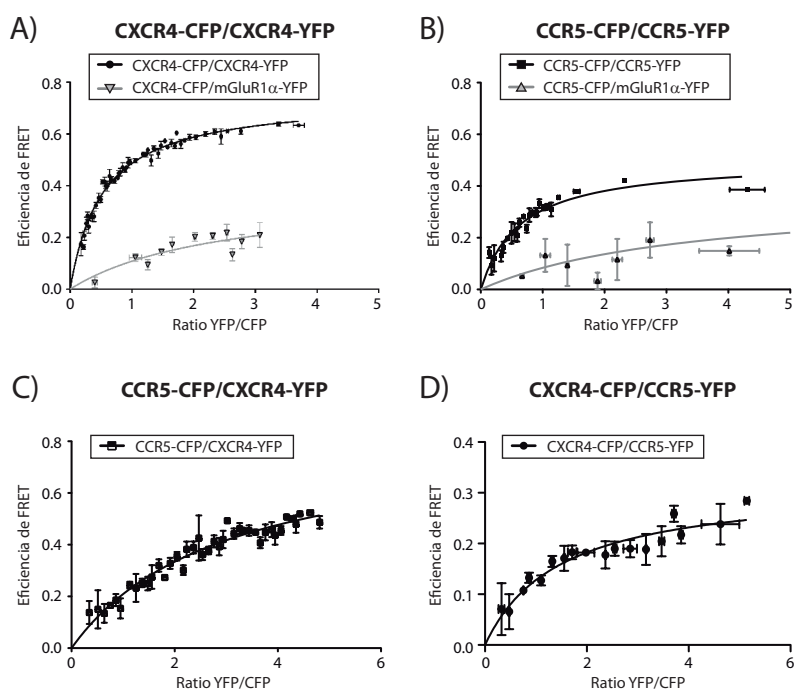


Figura 37: CXCR4 y CCR5 forman homo- y heterodímeros.

A, B) Para los homodímeros, las curvas de saturación de FRET fueron generadas en células HEK293T que expresaban cantidades constantes de CXCR4-CFP (2 μ g; ~375.000 UF) o CCR5-CFP (2 μ g; ~200.000 UF) y cantidades crecientes de CXCR4-YFP (~100.000 - 1.600.000 UF) o CCR5-YFP (~100.000 - 1.000.000 UF) o mGluR1 α -YFP (~150.000 - 1.100.000 UF). C, D) Para los heterodímeros, las células HEK293T expresaban cantidades constantes de CCR5-CFP (2 μ g; ~220.000 UF) o CXCR4-CFP (2 μ g; ~280.000 UF) y cantidades crecientes de CXCR4-YFP (~100.000 - 1.100.000 UF) o CCR5-YFP (~70.000 - 900.000 UF). En la tabla los valores de FRET_{max} y FRET₅₀ representan la media \pm SEM de al menos 5 experimentos, analizando los datos obtenidos con una ecuación de regresión no lineal aplicada a un modelo de un sitio de unión (UF: Unidades de fluorescencia, ND: No determinado).

Dímeros	FRET _{max}	FRET ₅₀
CXCR4-CFP/CXCR4-CFP	0,7418 \pm 0,0081	0,5245 \pm 0,0177
CCR5-CFP/CCR5-CFP	0,5100 \pm 0,0260	0,6693 \pm 0,0792
CXCR4-CFP/CCR5-CFP	0,2876 \pm 0,01634	0,5464 \pm 0,09458
CCR5-CFP/CXCR4-YFP	0,8229 \pm 0,0489	2,9040 \pm 0,3425
CXCR4-CFP/mGluR1 α -YFP	ND	ND
CCR5-CFP/mGluR1 α -YFP	ND	ND

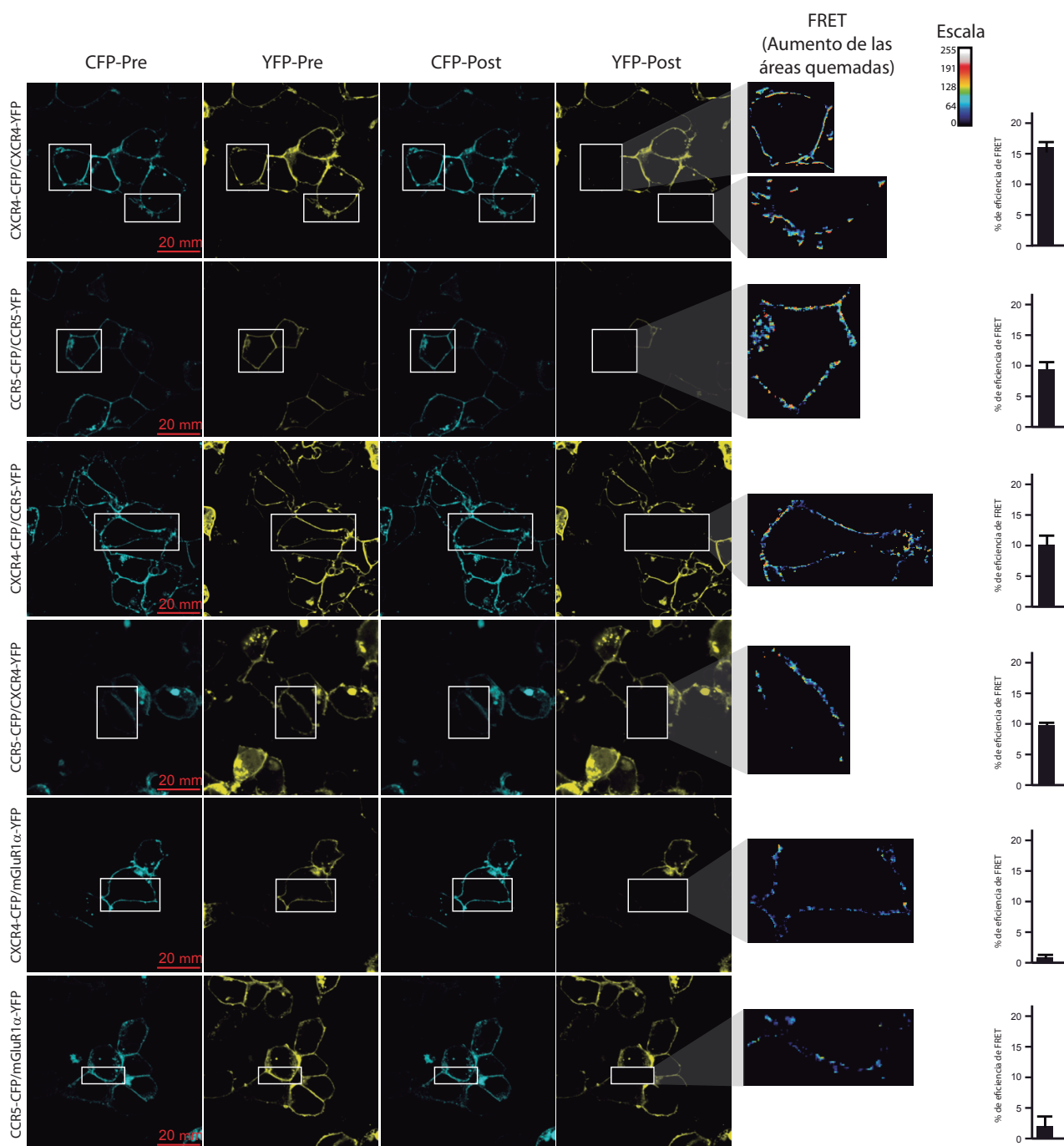


Figura 38: CXCR4 y CCR5 forman homo- y heterodímeros en la superficie celular. Imágenes representativas de CFP e YFP antes (CFP-Pre, YFP-Pre) y después (CFP-Post, YFP-Post) del quemado del aceptor, y aumento de las áreas quemadas (recuadrada con línea blanca), donde valoramos la eficiencia de FRET utilizando una escala de falsos colores. Cálculo de la media \pm SEM del FRET de al menos 20 imágenes. Las áreas utilizadas para el análisis tienen un ratio YFP/CFP similar al ratio obtenido cuando se llega a la fase de saturación en las curvas de FRET (Figura 37); ratios YFP/CFP ($\sim 2/1$ para homodímeros CXCR4/CXCR4 y heterodímeros CXCR4/CCR5 y CCR5/CXCR4, y $\sim 1/1$ para los homodímeros CCR5/CCR5). Como control negativo utilizamos CXCR4-CFP/mGluR1 α -YFP, CCR5-CFP/mGluR1 α -YFP.

Como control de especificidad no detectamos fluorescencia de YFP en células transfectadas con: 5-HT_{2B}-Rluc/ CXCR4-cYFP/CCR5-nYFP (**Figura 41A**).

Para confirmar estos datos utilizamos una técnica de BRET²/FRET secuencial (SRET²) (Carriba et al, 2008). Para ello co-transfectamos las células con cantidades constantes de la proteína dadora del BRET fusiona-

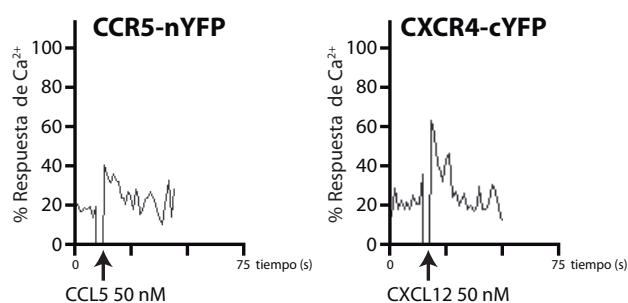


Figura 39: CCR5 y CXCR4 mantienen su funcionalidad fusionados a la proteína fluorescente YFP partida (nYFP y cYFP). Ensayos de movilización de Ca^{2+} en células HEK293T transfectadas transitoriamente con CCR5-nYFP o CXCR4-cYFP, y estimuladas con sus ligandos específicos, CCL5 (50 nM) y CXCL12 (50 nM) respectivamente. Experimento representativo de tres realizados.

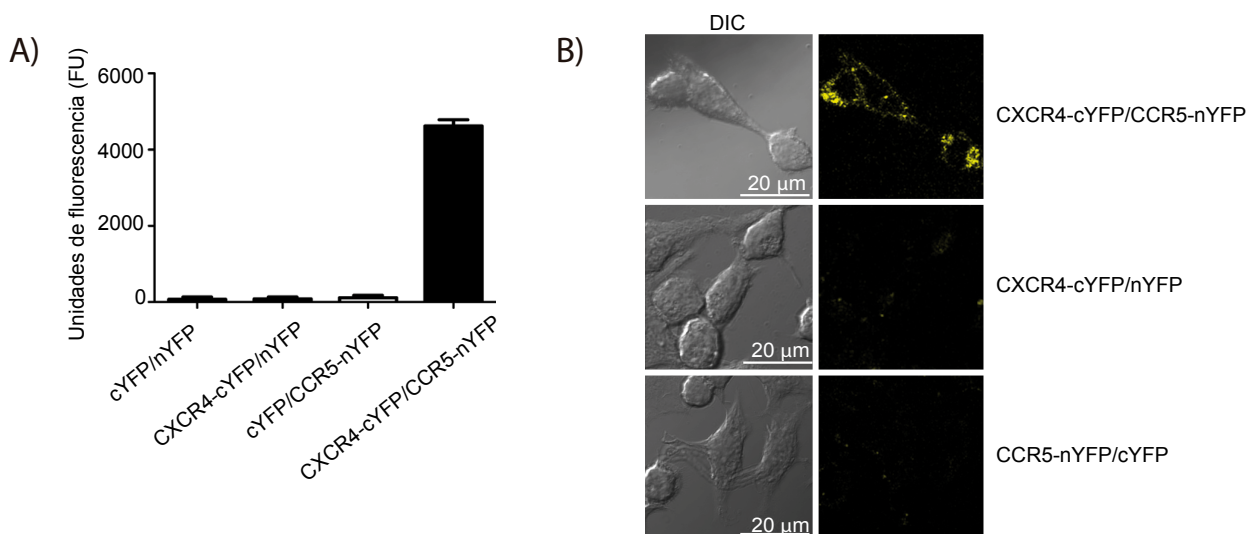


Figura 40: CXCR4 y CCR5 forman complejos heterodiméricos en la superficie celular. Interacción molecular entre CXCR4 y CCR5 detectada por BiFC. A) Células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con cantidades iguales de CXCR4-cYFP y CCR5-nYFP o con cYFP (pcDNA-cYFP) o nYFP (pcDNA-nYFP). La fluorescencia se determinó a 530 nm. Medias \pm SEM de 8 experimentos. B) Imágenes confocales de células HEK293T transfectadas transitoriamente (48 horas después de transfectar) (DIC: Diferencial de contraste de interferencia, del inglés: “diferencial interference contrast”).

da al extremo C-terminal de CD4 (CD4-Rluc), y de la proteína aceptora del BRET y dadora del FRET fusionada al extremo C-terminal de CXCR4 (CXCR4-CFP) y cantidades crecientes de la proteína aceptora del FRET fusionada al extremo C-terminal de CCR5 (CCR5-YFP). Detectamos curvas hiperbólicas de FRET al añadir el sustrato de BRET² (Deep-BlueC). Como control utilizamos 5-HT_{2B}-Rluc/CXCR4-CFP/CCR5-YFP, observando una eficiencia de FRET “residual” (Figura 41B). Todos estos datos confirman la existencia de

complejos heterotriméricos de CD4/CXCR4/CCR5 en ausencia de ligando.

2.2.-La expresión de CCR5 altera las conformaciones de los complejos homodiméricos CXCR4/CXCR4 y de los complejos heterodiméricos CD4/CXCR4

El siguiente paso fue determinar si la expresión de CCR5 alteraba las conformaciones de los homodímeros CXCR4/CXCR4 y de los heterodímeros CD4/CXCR4.

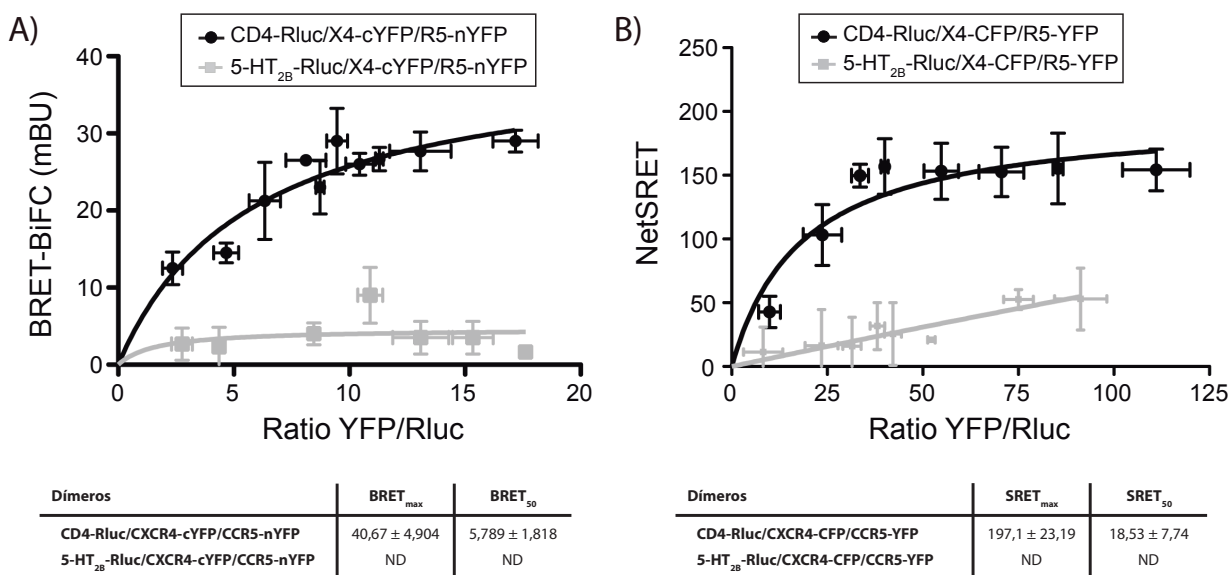


Figura 41: CD4, CXCR4 y CCR5 forman heterotrímeros. A) La hetero-oligomerización de CD4/CXCR4/CCR5 fue detectada por BRET-BiFC. Las curvas de saturación de BRET se obtuvieron utilizando células HEK293T co-transfectadas con cantidades constantes de CD4-Rluc (0,25 µg; ~ 75.000 UL) y cantidades crecientes de CXCR4-cYFP y CCR5-nYFP (0,2-3 µg; ~14.000 UF). Como control negativo se utilizaron células cotransfectadas con 5-HT_{2B}-Rluc (0,5 µg; ~100.000 UL). Los valores de BRET_{max} y BRET₅₀, representan la media ± SEM de 8 experimentos, analizando los datos obtenidos con una ecuación de regresión no lineal aplicada a un modelo de un sitio de unión. B) La hetero-oligomerización de CD4/CXCR4/CCR5 fue confirmada mediante SRET. Células HEK293T fueron cotransfectadas con cantidades constantes de CD4-Rluc (~ 50.000 UL), CXCR4-CFP (1 µg; ~20.000 UF) y cantidades crecientes de CCR5-YFP (0,2-1,5 µg; ~60.000 UF). Como control negativo se utilizaron células cotransfectadas con 5-HT_{2B}-Rluc (0,5 µg; ~60.000 UL), CXCR4-CFP (1 µg; ~20.000 UF) y cantidades crecientes de CCR5-YFP (0,2-1,5 µg; ~50.000 UF). Los valores de SRET_{max} y SRET₅₀, representan la media ± SEM de 8 experimentos, analizando los datos obtenidos con una ecuación de regresión no lineal aplicada a un modelo de un sitio de unión (UL: Unidades de luminiscencia, UF: Unidades de fluorescencia, ND: No determinado).

2.2.1-CCR5 altera la conformación del complejo homodimérico CXCR4/CXCR4

Transfectamos células HEK293T con CCR5 o con el vector vacío, y 24 horas después cotransfectamos con cantidades constantes de CXCR4-CFP y cantidades crecientes de CXCR4-YFP. Comprobamos por citometría de flujo la expresión de CCR5, y además verificamos que su expresión no modificaba las unidades de fluorescencia de CXCR4-CFP y CXCR4-YFP (**Figura 42A**). CCR5 afectó a la eficiencia de FRET de los complejos CXCR4/CXCR4, concretamente alteró el valor de FRET₅₀ (**Figura 42B**), indicando cambios en la afinidad aparente del par evaluado. Este cambio en la afinidad se traduce en un cambio conformacional en el homodímero CXCR4/CXCR4.

2.2.2-CCR5 altera la conformación del complejo heterodimérico CD4/CXCR4

A continuación analizamos el efecto que la coexpresión de CCR5 tiene sobre el complejo CD4/CXCR4. Células HEK293T se transfectaron con CCR5 o con el vector vacío, y 24 horas después con cantidades constantes de la proteína dadora CD4-Rluc, y cantidades crecientes de la proteína aceptora CXCR4-YFP. Comprobamos por citometría de flujo la expresión de CCR5 a los distintos ratios de la curva (**Figura 43A**), y también que la expresión de CCR5 no afecta a la luminiscencia emitida por CD4-Rluc ni a la fluorescencia emitida por CXCR4-YFP. Los experimentos de BRET demostraron que la expresión de CCR5 afecta significativamente a la curva de BRET de CD4/CXCR4, tanto en el valor de BRET_{max} como en el de BRET₅₀ (**Figura 43B**).

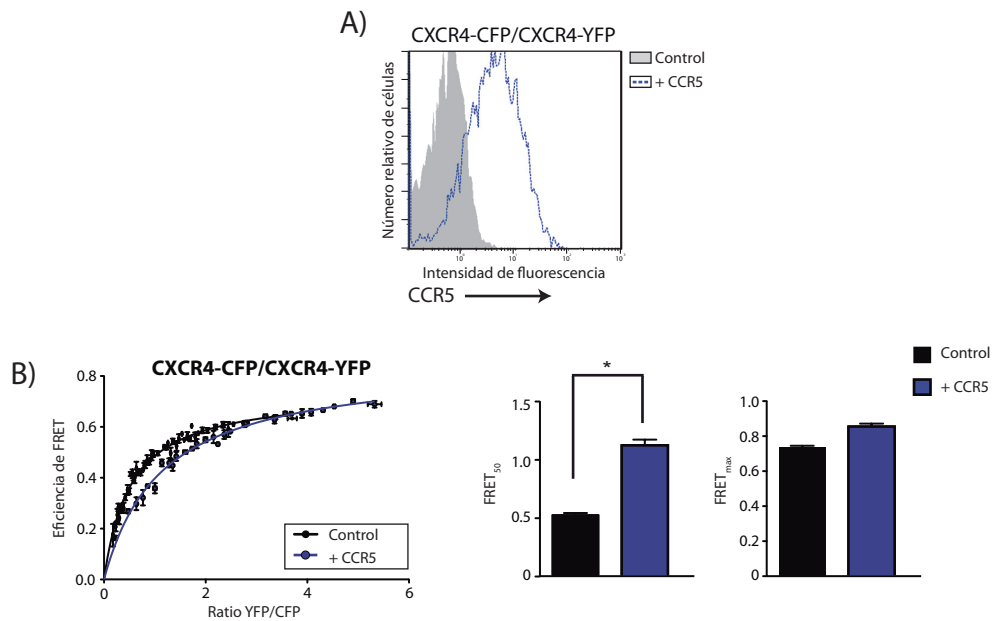


Figura 42: La expresión de CCR5 modula los complejos homodiméricos de CXCR4. A) Expresión de CCR5 en la membrana de células HEK293T transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5) + CXCR4-CFP/CXCR4-YFP a ratio ~2. La expresión de CCR5 mostrada se mantiene a los diferentes ratios de CXCR4-CFP/CXCR4-YFP. B) Células HEK293T transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 o pcDNA3.1CCR5, se cotransfectaron 24 horas después con cantidades constantes de CXCR4-CFP y cantidades crecientes de CXCR4-YFP. Se muestra un experimento representativo de 6 realizados. En las células que coexpresan CXCR4-CFP/CXCR4-YFP + CCR5 los valores de FRET₅₀ aumentaron significativamente en los 6 experimentos en relación a las células que coexpresan CXCR4-CFP/CXCR4-YFP + pcDNA 3.1. Se representaron los valores de FRET_{max} y FRET₅₀ como la media \pm SEM.

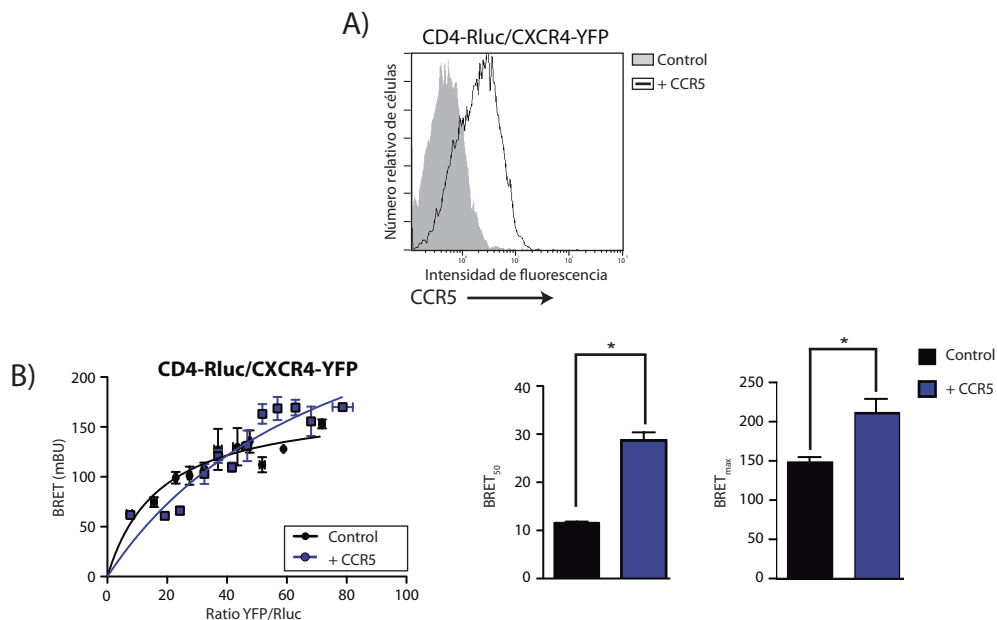


Figura 43: La expresión de CCR5 modula los complejos heterodiméricos CD4/CXCR4. A) Expresión de CCR5 en la membrana de células HEK293T transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5) + CD4-Rluc/CXCR4-YFP. La expresión de CCR5 mostrada se mantiene a los diferentes ratios de CD4-Rluc/CXCR4-YFP. B) Células HEK293T transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 o pcDNA3.1CCR5, se cotransfectaron 24 horas después con cantidades constantes de CD4-Rluc y cantidades crecientes de CXCR4-YFP. Se muestra un experimento representativo de 5 realizados. En las células que coexpresan CD4-Rluc/CXCR4-YFP + CCR5 los valores de BRET₅₀ y BRET_{max} aumentaron significativamente en los 5 experimentos en relación a las células que coexpresan CD4-Rluc/CXCR4-YFP + pcDNA 3.1. Se representaron los valores de BRET_{max} y BRET₅₀ como la media \pm SEM.

Estos datos indican que la coexpresión de CCR5 altera la conformación de los complejos heterodiméricos CD4/CXCR4.

2.3.-CCR5 modula la entrada de virus VIH-1 X4 en células que coexpresan CD4/CXCR4

Las cepas X4 del VIH-1 utilizan CD4 y CXCR4 como co-receptor para infectar a las células. Ya que CCR5, por la formación de complejos heterotriméricos CD4/CXCR4/CCR5, está modulando la conformación de los receptores CD4 y CXCR4, quisimos estudiar si la coexpresión de CCR5 podrá estar afectando a la entrada de cepas X4 de VIH-1. Para ello, utilizamos células HEK293T infectadas con virus *Vaccinia* promoviendo la expresión de la proteína gp120_{IIIB} (células efectoras), y células HEK293 CD4 que expresan endógenamente CXCR4, transfectadas transitoriamente con concentraciones crecientes de CCR5 o con el vector vacío (células hésped).

Comprobamos mediante citometría de flujo que la expresión de CCR5 no alteraba los niveles de expresión de CD4 y CXCR4 (**Figura 44A,B**).

Observamos que la co-expresión de CCR5 redujo significativamente la fusión celular (**Figura 44A**).

Para confirmar que este efecto era específico de la expresión de CCR5 en la membrana plasmática, decidimos comprobar la fusión celular tras la internalización de CCR5. Para ello comprobamos previamente que el estímulo con CCL5 (100 nM) provocó una rápida internalización de CCR5 sin afectar a los niveles de CD4 ni de CXCR4 de la superficie celular ($42\% \pm 3,2\%$ en 30 min) (**Figura 45B**). Realizamos entonces en esas condiciones los ensayos de fusión celular, observando que la inhibición inicial disminuía, recuperándose por tanto la fusión a medida que CCR5 era internalizado (**Figura 45A**).

Estos datos indican que dependiendo de los niveles de expresión de CCR5, y como consecuencia de la formación de complejos CD4/CXCR5/CCR5, se produce una disminución de la fusión de las cepas X4 del VIH-1.

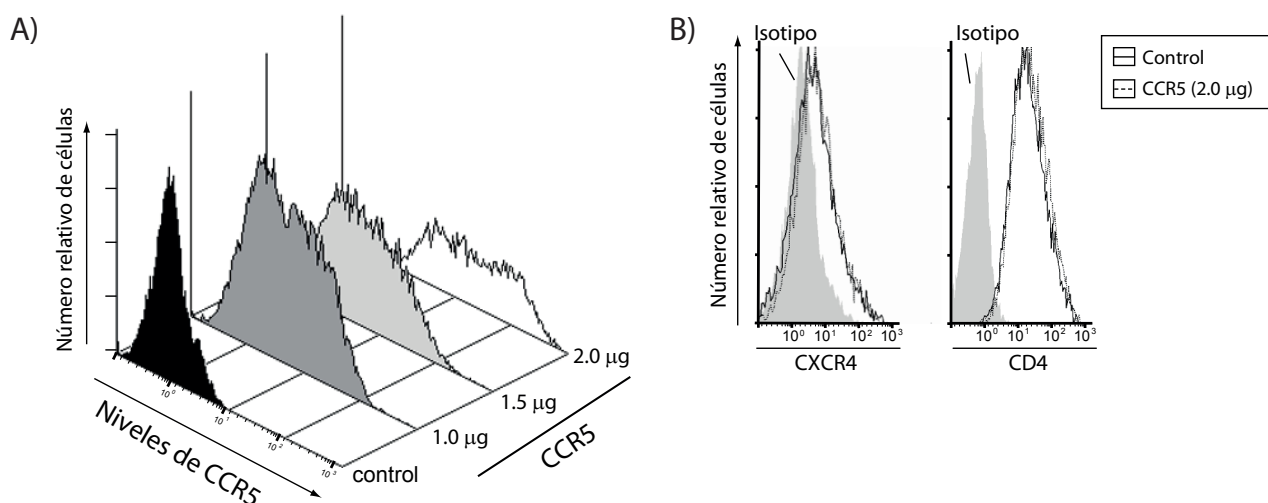


Figura 44: Análisis de los niveles de expresión de CCR5, CD4 y CXCR4 en células transfectantes HEK293T. A) Análisis por citometría de flujo de los niveles de CCR5 en la membrana plasmática de células HEK293CD4 transfectadas con diferentes cantidades de CCR5. Como control utilizamos las mismas células transfectadas con el vector vacío (pcDNA3.1). B) Análisis por citometría de flujo de los niveles de CD4 y CXCR4 en células HEK293CD4 transfectadas con CCR5 (2µg, pcDNA3.1CCR5) o el vector vacío (pcDNA3.1).

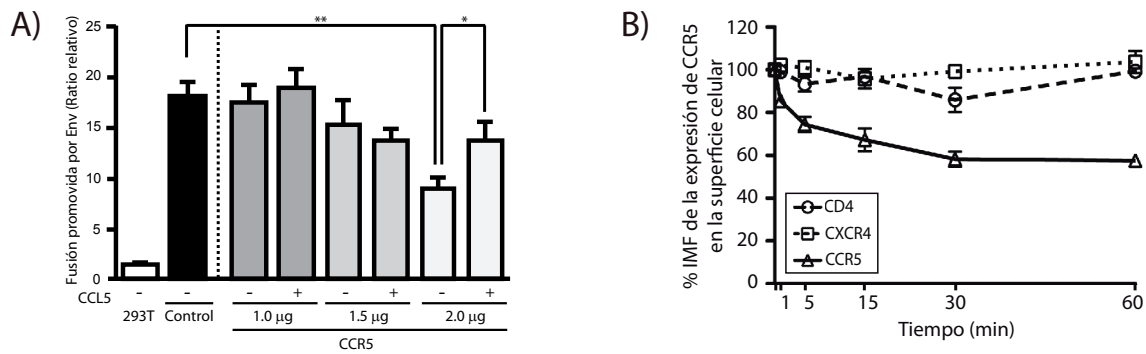


Figura 45: La coexpresión de CCR5 reduce la entrada de cepas X4 del VIH-1 en células CD4/CXCR4. A) Fusión celular entre células efectoras (HEK293T Env_{IIIIB}) y células diana (HEK293CD4) transfectadas con diferentes cantidades de CCR5 (Figura 44). B) Las células HEK293CD4 transfectadas transitoriamente con CCR5 fueron estimuladas con CCL5 (100 nM) y medidos los niveles de CD4, CXCR4 y CCR5 en la membrana plasmática. A) Las células diana fueron estimuladas con CCL5 en condiciones de máxima internalización (100 nM, 30 min) antes de la fusión celular. Los datos se representaron como el ratio relativo de la fusión inducida por Env tomando como referencia células HEK293T. Media \pm SEM de cinco experimentos (triplicados) (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

2.4.-CCR5 reduce la infección por cepas X4 del VIH-1

Para comprobar si el bloqueo de fusión observado en experimentos “*in vitro*” sucedía también con cepas primarias de VIH-1, nucleofectamos células Jurkat CD4 o células T CD4⁺ humanas con CCR5 o el vector vacío, y tras analizar por citometría de flujo los niveles de los receptores después de la transfección

(Figura 46A,B), infectamos las células con la cepa VIH-1_{NL4-3}. Después de 48 horas determinamos por ELISA los niveles de p24 en el sobrenadante como medida de infección viral (Figura 46C,D).

Los resultados indicaron que la coexpresión de CCR5 también reduce la infección de cepas X4 del VIH-1.

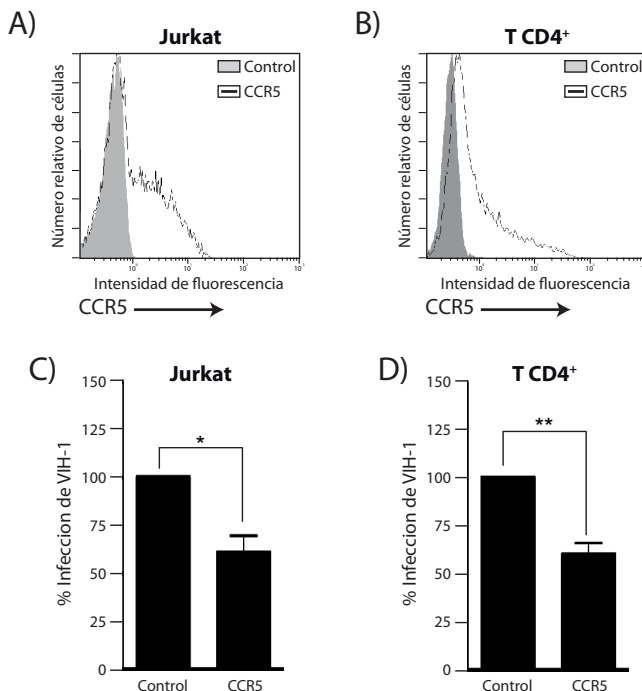


Figura 46: La expresión de CCR5 reduce la infección del VIH-1 en células Jurkat y células T CD4⁺. A, B) Análisis por citometría de flujo de los niveles de CCR5 en la membrana plasmática de A) Jurkat o B) células T CD4⁺. C) La expresión de CCR5 (como en A) reduce significativamente la infección del VIH-1 en células Jurkat. Media \pm SEM de 4 experimentos (cuadruplicado) (* $p < 0,05$). D) La infección viral de células T CD4⁺ nucleofectadas con CCR5 (como en B) fue reducida significativamente en comparación a las células control (células T CD4⁺ nucleofectadas con pcDNA3.1). Media \pm SEM de 5 experimentos (cuadruplicado) (** $p < 0,01$).

2.5.-La expresión de CCR5 modifica el cambio conformacional promovido por gp120_{IIIB} sobre los complejos CD4/CXCR4

Pasamos entonces a estudiar el mecanismo por el cual la expresión de CCR5 afecta a la infección por cepas X4 de VIH-1.

En primer lugar estudiamos, con ensayos de BRET¹, el cambio conformacional promovido por gp120_{IIIB} sobre los complejos CD4/CXCR4 y como la expresión de CCR5 lo modula. Células HEK293T se transfectaron con CCR5 o con el vector vacío, y 24 horas después se cotransfectaron con cantidades constantes de CD4-Rluc y cantidades crecientes de CXCR4-YFP. Determinamos entonces la eficiencia de BRET antes y después de estimular con gp120_{IIIB}. Analizamos las curvas de BRET obtenidas para CD4/CXCR4 y CD4/CXCR4 + CCR5 en ausencia y en presencia de la gp120_{IIIB}, y observamos que gp120_{IIIB} modulaba la eficiencia de BRET de los complejos CD4/CXCR4, pero no promovía ningún efecto sobre los complejos CD4/CXCR4/CCR5 (**Figura 47**). Esto sugiere que la coexpresión de CCR5 bloquea el cambio conformacional promovido por gp120_{IIIB} sobre los complejos CD4/CXCR4.

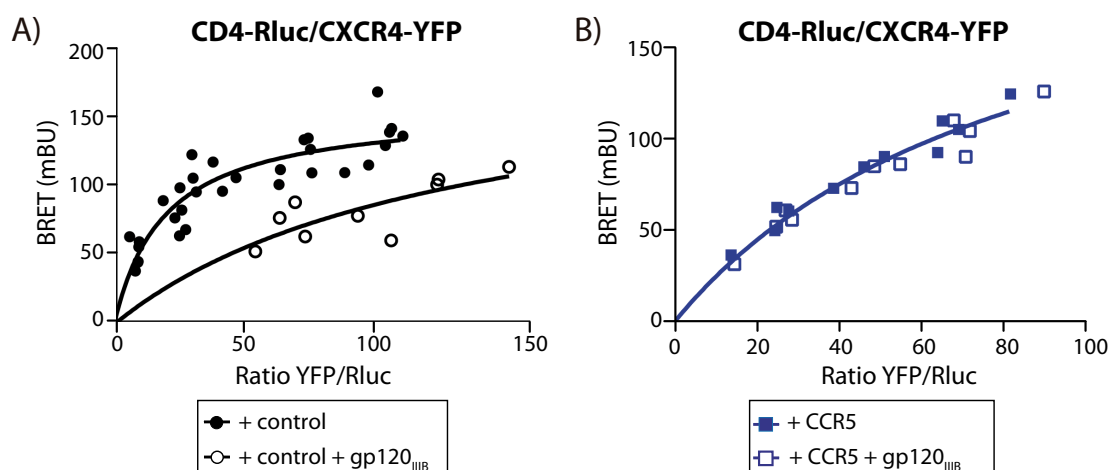


Figura 47: La expresión de CCR5 modifica el cambio conformacional promovido por la gp120_{IIIB} sobre los complejos CD4/CXCR4. A, B) Células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con A) pcDNA3.1 (control) o B) pcDNA3.1CCR5 (CCR5). A las 24 horas se cotransfectaron con cantidades constantes de CD4-Rluc y cantidades crecientes de CXCR4-YFP. Estas células fueron estimuladas con gp120_{IIIB} (5 nM, 5 min, 37 °C). Los datos obtenidos fueron analizados con una ecuación de regresión no lineal aplicada a un modelo de un sitio de unión. Experimento representativo de cuatro realizados.

2.6.-La expresión de CCR5 bloquea la polimerización de actina promovida por gp120_{IIIB}

La unión de la gp120 promueve una rápida y transitoria polimerización de actina de forma similar a como lo hace CXCL12 al unirse a CXCR4 (Balabanian et al, 2004; Vorster et al, 2011; Yoder et al, 2008).

Estudiamos el efecto de la gp120_{IIIB} sobre la polimerización de actina en células HEK293 que coexpresan CD4/CXCR4 o CD4/CXCR4/CCR5, estudiando por citometría de flujo la tinción con Faloidina-FITC. La gp120_{IIIB} promueve una rápida (5-15 minutos) polimerización de la actina en las células que coexpresan CD4/CXCR4, pero no en aquellas células que coexpresan CD4/CXCR4/CCR5 (**Figura 48A,B**). Realizamos un estudio similar mediante microscopía confocal utilizando Faloidina-Alexa488 sobre células HEK293 CD4/CXCR4 transfectadas transitoriamente con CCR5-RFPm y estimuladas con gp120_{IIIB}, y observamos en las células CD4/CXCR4, que la gp120_{IIIB} promueve la polimerización y reorganización de la F-actina, pero no en las células CD4/CXCR4/CCR5 (**Figura 48C,D**). Como control, la estimulación con CXCL12 promovió polimerización de la F-actina tanto en las células CD4/CXCR4 como en células CD4/CXCR4/CCR5 (**Figura 49A,B,C**).

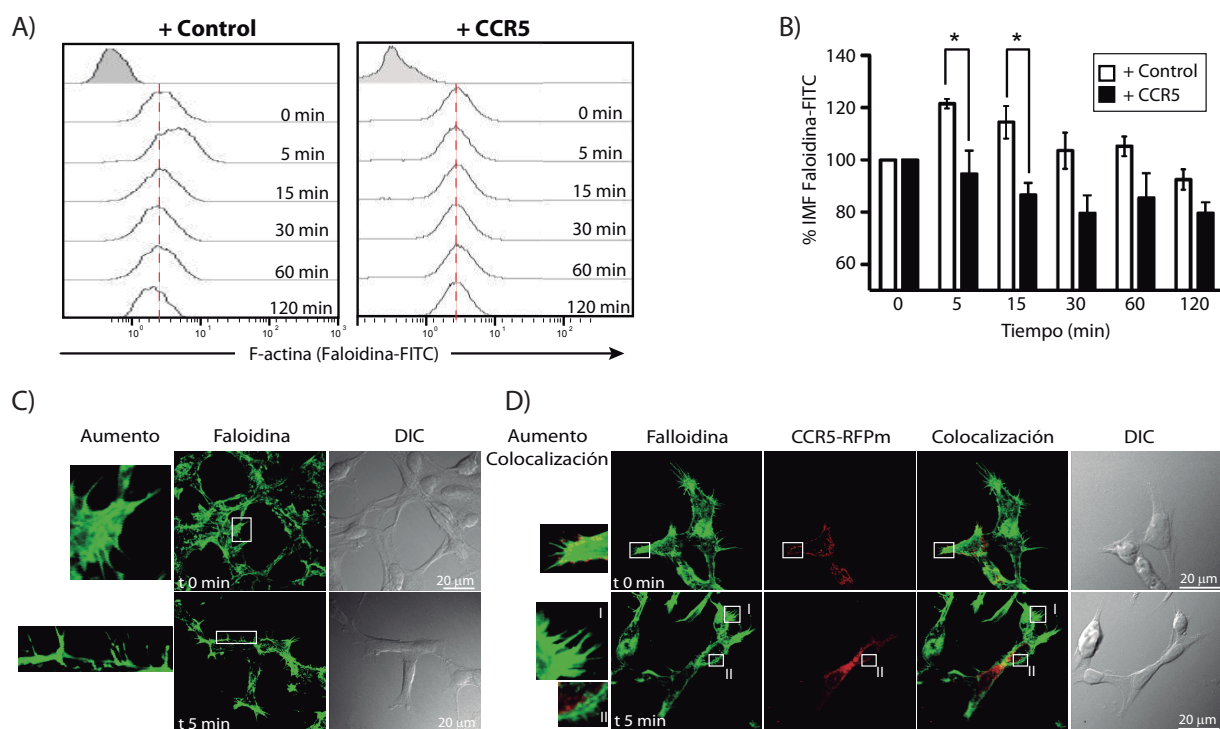
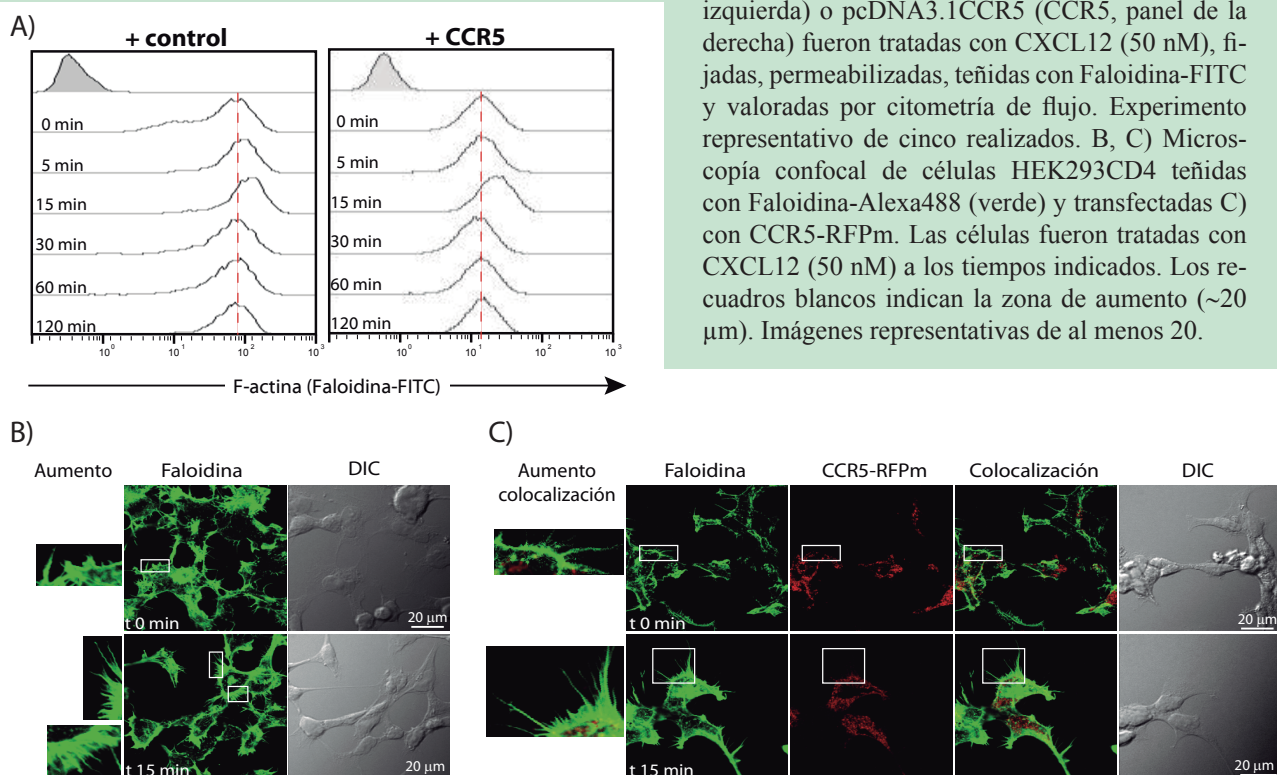
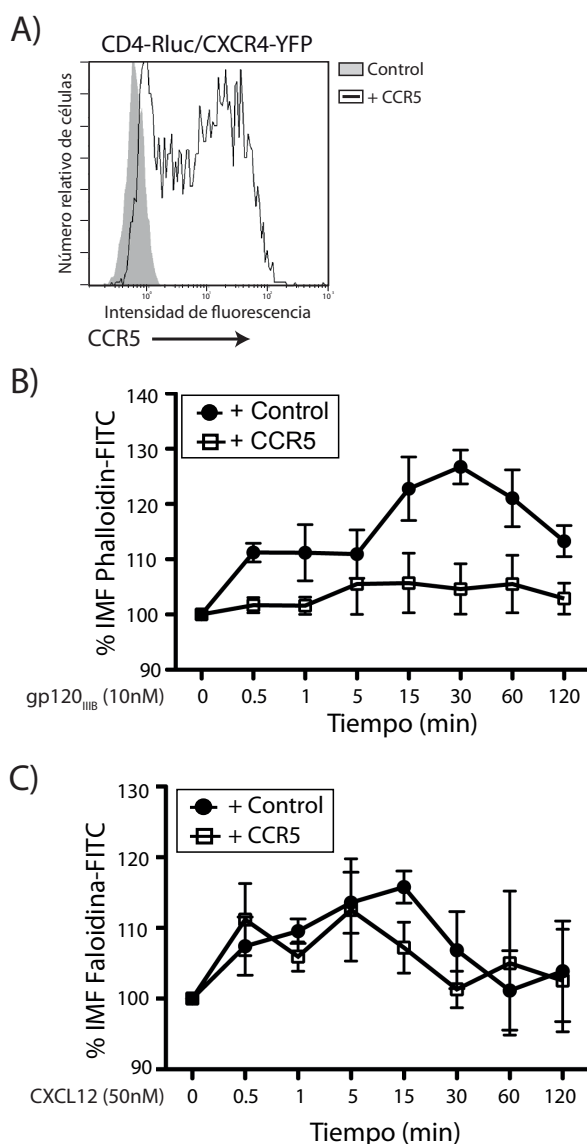


Figura 48: La expresión de CCR5 bloquea la polimerización de actina promovida por la gp120_{IIIB} en células HEK293CD4. A) Células HEK293CD4 transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 (control, panel de la izquierda) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5, panel de la derecha) fueron tratadas con gp120_{IIIB} (10 nM), fijadas, permeabilizadas, teñidas con Faloidina-FITC y valoradas por citometría de flujo. B) Cuantificación de la polimerización de actina en A). Media \pm SEM de cinco experimentos (* $p < 0,05$). C, D) Microscopía confocal de células HEK293CD4 teñidas con Faloidina-Alexa488 (verde) y transfectadas D) con CCR5-RFPm. Las células fueron tratadas con gp120_{IIIB} (10 nM) a los tiempos indicados. Los recuadros blancos indican la zona de aumento ($\sim 20 \mu\text{m}$). Imágenes representativas de al menos 20.

Figura 49: La expresión de CCR5 no afecta a la polimerización de actina promovida por CXCL12 en células HEK293CD4. A) Células HEK293CD4 transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 (control, panel de la izquierda) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5, panel de la derecha) fueron tratadas con CXCL12 (50 nM), fijadas, permeabilizadas, teñidas con Faloidina-FITC y valoradas por citometría de flujo. Experimento representativo de cinco realizados. B, C) Microscopía confocal de células HEK293CD4 teñidas con Faloidina-Alexa488 (verde) y transfectadas C) con CCR5-RFPm. Las células fueron tratadas con CXCL12 (50 nM) a los tiempos indicados. Los recuadros blancos indican la zona de aumento ($\sim 20 \mu\text{m}$). Imágenes representativas de al menos 20.



Estudiamos a continuación si el efecto ocurría en células primarias. Células T CD4⁺ humanas fueron activadas con PHA e IL2 para aumentar los niveles de expresión de CCR5. En estas condiciones observamos que los niveles de CXCR4 eran menores, por lo que no pudimos usar esta estrategia. Nucleofectamos entonces células T CD4⁺ humanas con CCR5 o con el vector vacío y comprobamos por citometría de flujo los niveles tanto de CD4 como de CXCR4 y de CCR5 (**Figura 50A**). Al igual que sucedía con las HEK293, observamos que gp120_{IIIIB} provocaba una rápida polimerización de la actina (0,5-1 minuto) en las células T CD4⁺ pero no en las células T CD4⁺ CCR5⁺ (**Figura 50B**). Como control observamos tanto en células T CD4⁺ como en T CD4⁺ CCR5⁺ que la polimerización de la actina promovida por CXCL12 era similar (**Figura 50C**).



Estos datos confirman que los efectos promovidos por la gp120_{IIIIB} en la célula están bloqueados por la coexpresión de CCR5.

Otro de los efectos de la estimulación con gp120_{IIIIB} sobre los linfocitos T es que cambian su morfología, pierden su esfericidad adquiriendo un fenotipo mas polarizado. Células T CD4⁺ fueron electroporadas con CCR5 (pcDNA-CCR5) o con el vector vacío (pcDNA). Después de 24 horas fueron estimuladas con gp120_{IIIIB}, marcadas con Faloidina Alexa-488 y analizadas por microscopía confocal. En ausencia del estímulo, tanto las células T CD4⁺ como las T CD4⁺ CCR5⁺ presentaban un fenotipo redondeado con una fina tinción de la F-actina (**Figura 51A**). Al estimularlas con la gp120_{IIIIB} observamos cambios en la esfericidad celular, puestos de manifiesto por la tinción con Faloidina. Sin embargo, el efecto no ocurrió en células T CD4⁺ CCR5⁺ (**Figura 51A**). Cuantificamos la esfericidad de las células con el programa Imaris, observando que la coexpresión de CCR5 bloqueó el cambio de morfología de las células estimuladas con la gp120_{IIIIB} (**Figura 51B**). Como control realizamos el mismo análisis, estimulando las células con CXCL12 y observando la misma respuesta en cuanto al cambio de esfericidad en células T CD4⁺ y en células T CD4⁺ CCR5⁺ (**Figura 52A,B**).

Todos estos resultados confirman que la expresión de CCR5, tanto en células HEK293CD4 como en células T CD4⁺, inhibe los efectos promovidos por la gp120_{IIIIB}.

Figura 50: La polimerización de actina promovida por gp120_{IIIIB} en células T CD4⁺ se ve bloqueada por la expresión de CCR5. A) Análisis por citometría de flujo de los niveles de CCR5 en la membrana plasmática de células T CD4⁺ nucleofectadas con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5). B, C) Células T CD4⁺ control y CCR5 fueron estimuladas con B) gp120_{IIIIB} (10 nM) o C) CXCL12 (50 nM). Se estudió la polimerización de actina, tiñendo con Faloidina-FITC a diferentes tiempos. Para las células nucleofectadas con CCR5, se evaluarón solamente las células CCR5⁺ (teñidas con anti-CCR5).

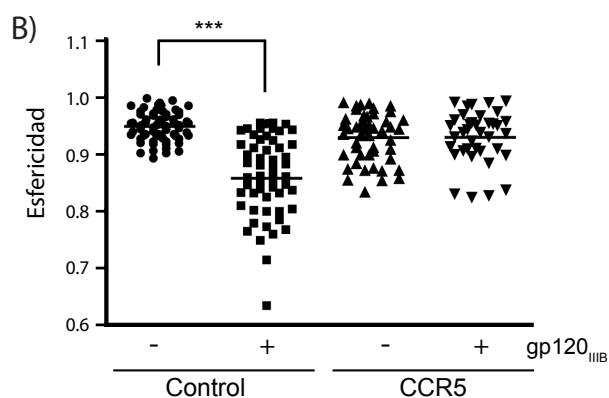
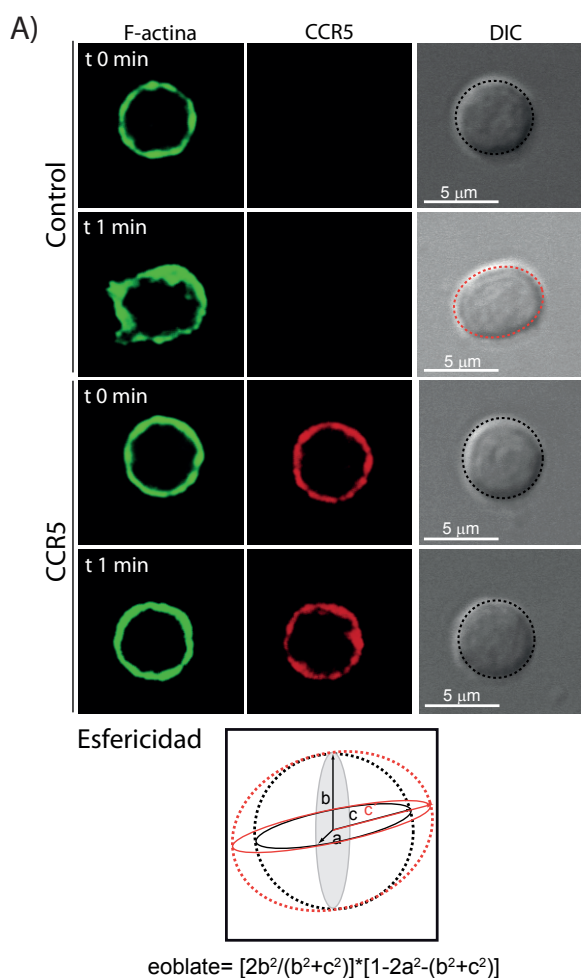


Figura 51: La expresión de CCR5 bloquea el cambio de la morfología celular promovido por gp120_{IIIIB}. A) La tinción de F-actina (Faloidina-Alexa488, verde) y CCR5 (anti-CCR5Cy3, rojo) fue detectada por microscopía confocal en células T CD4⁺ nucleofectadas con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5), y tratadas con gp120_{IIIIB} (10 nM, 1 min, 37 °C). La línea punteada en las imágenes DIC indica la morfología celular (esfericidad). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos. La fórmula utilizada para el cálculo de la esfericidad de la línea punteada es: (esfericidad = $[2b^2/(b^2+c^2)] \times [1-2a^2-(b^2+c^2)]$). B) Análisis cuantitativo del efecto de la estimulación con gp120_{IIIIB} sobre la esfericidad obtenida en las imágenes de confocal de la tinción de actina en A). (***) $p < 0,001$.

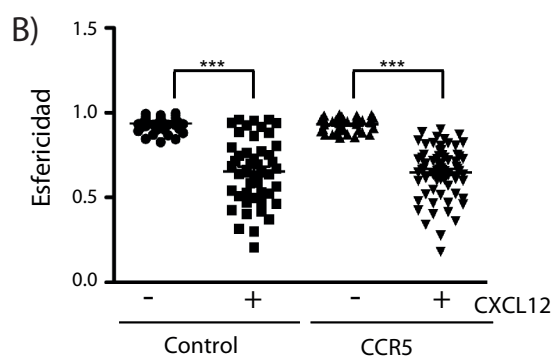
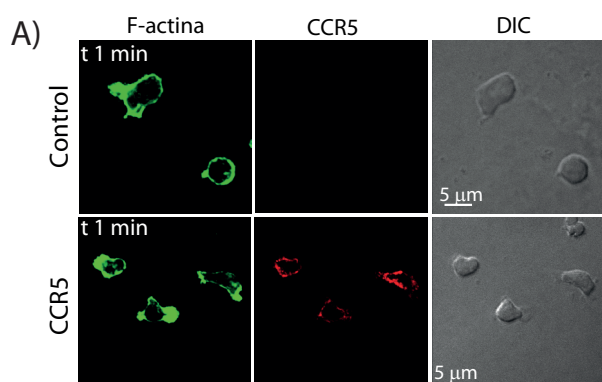


Figura 52: La expresión de CCR5 no afecta al cambio de la morfología celular promovido por CXCL12. A) La tinción de F-actina (Faloidina-Alexa488, verde) y CCR5 (anti-CCR5Cy3, rojo) fue detectada por microscopía confocal en células T CD4⁺ nucleofectadas con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5), y tratadas con CXCL12 (50 nM, 1 min, 37 °C). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos. B) Análisis cuantitativo del efecto de la estimulación con CXCL12 sobre la esfericidad obtenida en las imágenes de confocal de la tinción de actina en A). (***) $p < 0,001$.

2.7.-La expresión de CCR5 bloquea la fosforilación de LIMK1 y cofilina promovida por gp120_{IIIB}

Se ha descrito que la activación de LIMK1 y la consecuente fosforilación de la cofilina juegan un papel clave en la polimerización de la actina promovida por la gp120 (Vorster et al, 2011; Yoder et al, 2008). Por este motivo estudiamos a continuación el efecto de la coexpresión de CCR5 en la activación de LIMK1 y la fosforilación de cofilina promovida por gp120.

En células HEK293 CD4/CXCR4, gp120_{IIIB} promueve una rápida fosforilación (15 segundos) de la cofilina que se mantuvo durante unos 15 minutos (Figura 53A). Mientras que en las células HEK293 que expresan CD4/CXCR4/CCR5 no se detectó dicha fosforilación de la cofilina (Figura 53A). No obstante, sí que se produjo la fosforilación de la cofilina en ambos tipos celulares tras la estimulación con CXCL12 (Figura 53B).

Realizamos el mismo estudio en células T CD4⁺ humanas nucleofectadas con CCR5 o con el vector vacío. En primer lugar comprobamos los niveles de CCR5 en estas células (Figura 54A). Cuando estimulamos las células T CD4⁺ con la gp120_{IIIB} se produjo una rápida activación de la LIMK1 (30 segundos) seguida por la fosforilación de la cofilina (1 minuto),

mientras que en las células T CD4⁺ CCR5⁺ no detectamos ni la fosforilación de la cofilina ni la activación de LIMK1 (Figura 54B). Como control, observamos que la estimulación con CXCL12 promueve la activación de LIMK1 y fosforilación de la cofilina en ambos tipos celulares (células T CD4⁺ y T CD4⁺ CCR5⁺) (Figura 54C).

Estos datos confirman que la expresión de CCR5 impide la reorganización de la actina promovida por la gp120_{IIIB}. Ya que no se activa LIMK1 y por tanto la cofilina se mantiene activa, inhibiendo la polimerización de la misma.

2.8.-La expresión de CCR5 bloquea la unión de gp120_{IIIB} en células que coexpresan CD4 y CXCR4

Un aspecto importante para determinar la causa de esta falta de función de gp120_{IIIB} cuando la célula expresa CD4/CXCR4/CCR5, es determinar la unión del ligando al receptor. Para ello empleamos el método anteriormente descrito de las partículas lentivirales inmovilizadas en un biosensor. En primer lugar generamos partículas lentivirales que presentan los receptores que queremos estudiar en su membrana transfectando las células HEK293T (como control negativo ya que expresan CXCR4 endógenamente) o HEK293CD4 con el vector vacío (pcDNA3.1). Después de 24

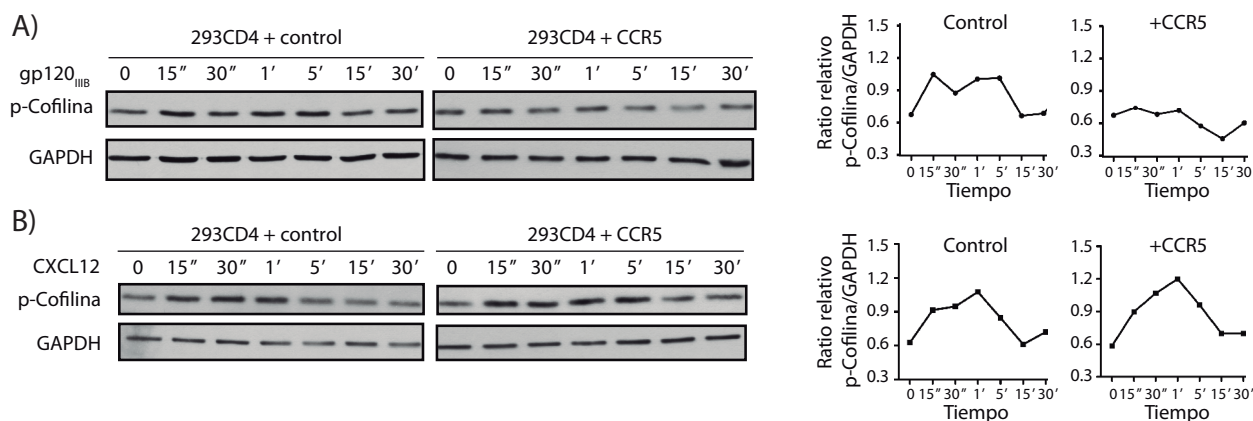


Figura 53: La expresión de CCR5 bloquea la fosforilación de cofilina promovida por gp120_{IIIB} en células HEK293CD4. A, B) Células HEK293CD4 transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5) fueron estimuladas, los tiempos indicados, con A) gp120_{IIIB} (10 nM) o B) CXCL12 (50 nM). Los lisados celulares obtenidos fueron analizados por western blot utilizando anti-pcofilina. Como control de carga se utilizó anti-GAPDH. Densitometría de la fosforilación de cofilina (paneles de la derecha). Experimento representativo de tres realizados.

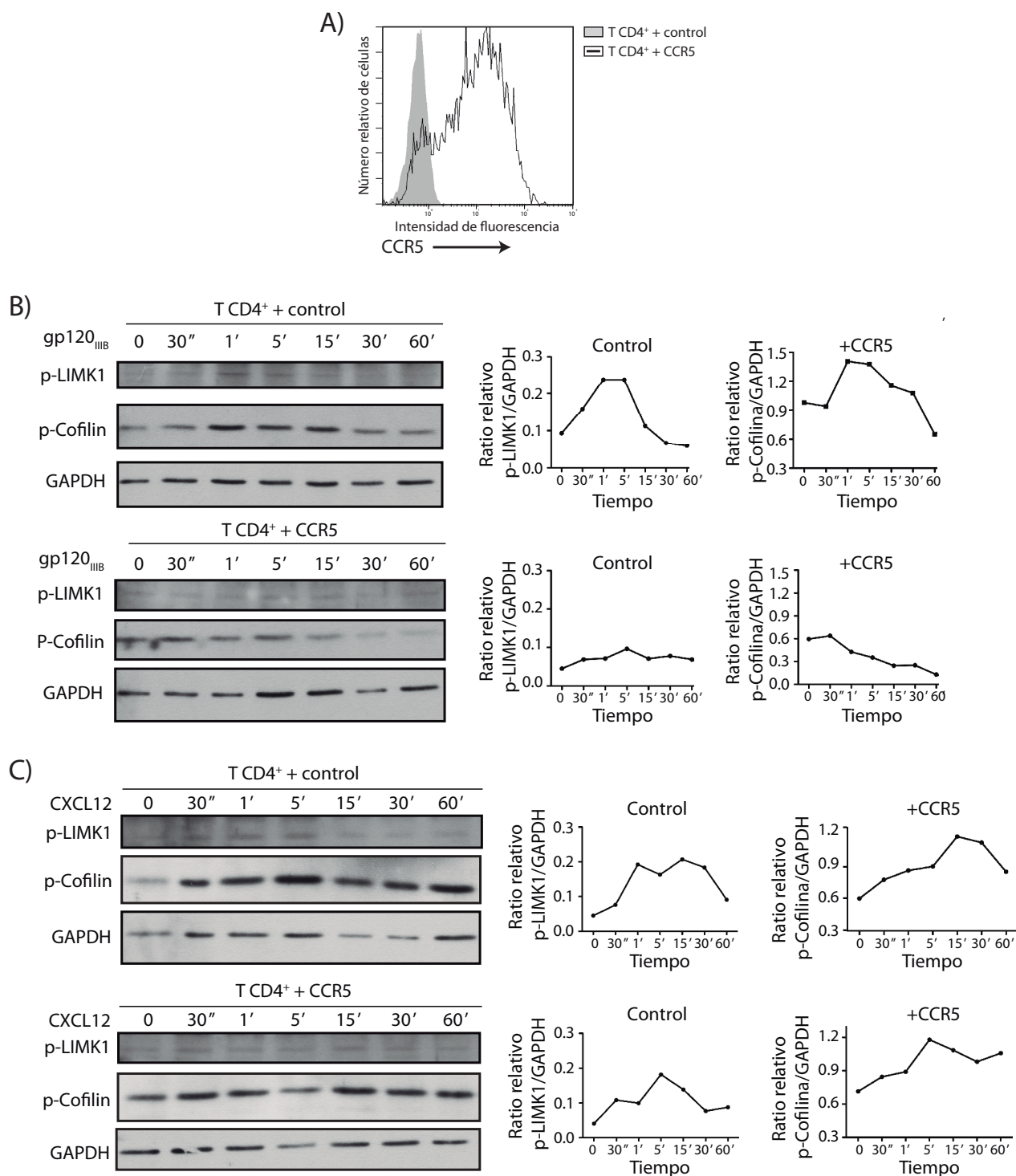


Figura 54: La expresión de CCR5 bloquea la activación de LIMK1 y la fosforilación de cofilina promovidas por la gp120_{IIIB} en células T CD4⁺. A) Niveles de expresión de CCR5 por citometría de flujo en células T CD4⁺ nucleofectadas con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5). B, C) Las células nucleofectadas fueron estimuladas, los tiempos indicados, con B) gp120_{IIIB} (10 nM) o C) CXCL12 (50 nM). Los lisados celulares obtenidos fueron analizados por western blot utilizando anti-pLIMK1 y anti-pcofilina. Como control de carga se utilizó anti-GAPDH. Los paneles de la derecha muestran las densitometrías de cada condición. Experimento representativo de tres realizados.

horas se cotransfectaron los plásmidos para generar las partículas lentivirales (pLVTHM/GFP, psPAX2 y pCMV-VSVG). Las partículas generadas salen de la célula hospedadora mediante el proceso de “budding” llevándose parte de la membrana celular, incluidos los receptores previamente coexpresados, obteniendo así 4 tipos de partículas lentivirales, CXCR4, CXCR4/CCR5, CD4/CXCR4 y CD4/CXCR4/CCR5.

Caracterizamos las partículas lentivirales generadas por citometría de flujo y por western blot. No observamos ninguna diferencia en los niveles de CXCR4 en las distintas partículas lentivirales (**Figura 55A**) y detectamos específicamente las partículas lentivirales que presentaban CCR5 y CD4 (**Figura 55B**). Después de la caracterización titulamos las partículas lentivirales, ya que tienen capacidad de infectar las células HEK293T.

Para realizar los ensayos cinéticos de unión, pusimos la misma cantidad de cada una de las partículas lentivirales generadas, sobre un canal del chip del biosensor. Pasamos diferentes concentraciones de gp120_{IIIIB} (50-250 nM) por los canales del chip, observando la unión del ligando (fase de asociación) que llegará a saturación, y alcanzará un equilibrio de asociación/disociación. Entonces, el ligando se sustituye por PBS para analizar así la disociación del ligando. A partir de los datos de la fase de asociación y disociación, utilizamos el programa Biaevaluation 4.1 de Biacore para calcular las constante de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) respectivamente, y a partir de estos datos la constante de afinidad (KD).

Para el cálculo final de los parámetros para las partículas CD4/CXCR4 y CD4/CXCR4/CCR5, restamos los valores obtenidos en los canales de referencia de las partículas que llevan sólo CXCR4 y CXCR4/CCR5 (ya que no llevan CD4 que es donde se une inicialmente la gp120_{IIIIB}). Observamos que la gp120_{IIIIB} solamente se une a las partículas CD4/CXCR4 (**Figura 56A**), y sin embargo no fue detectada sobre las partículas CD4/CXCR4/CCR5 (**Figura 56B**). Como control evaluamos la unión de CXCL12 a las diferentes partículas lentivirales, y calculamos también sus parámetros de unión. En este caso la unión de CXCL12 fue similar en todas las partículas lentivirales (**Figura 57**).

La presencia de CCR5 impide la unión de gp120_{IIIIB}. Para confirmarlo decidimos realizar ensayos de unión de gp120_{IIIIB} marcada con ¹²⁵I (¹²⁵I-gp120_{IIIIB}), utilizando células HEK293 CD4 transfectadas con CCR5 o con el vector vacío mientras que como control negativo utilizamos las células HEK293T transfectadas también con CCR5 y con el vector vacío. En primer lugar comprobamos por citometría de flujo que los niveles de CCR5 en ambos tipos celulares eran similares (**Figura 58A**). ¹²⁵I-gp120_{IIIIB} sólo se unió a las células HEK293 CD4/CXCR4 y su constante de afinidad (KD 8,01 ± 0,8 x 10⁻⁸ M) fue similar a la descrita en la bibliografía (**Figura 58B**).

Todos estos datos indican que la expresión de CCR5 promueve un cambio conformational de los complejos heterodiméricos CD4/CXCR4 que impiden la unión de la gp120_{IIIIB}, y como consecuencia también la infección de cepas X4.

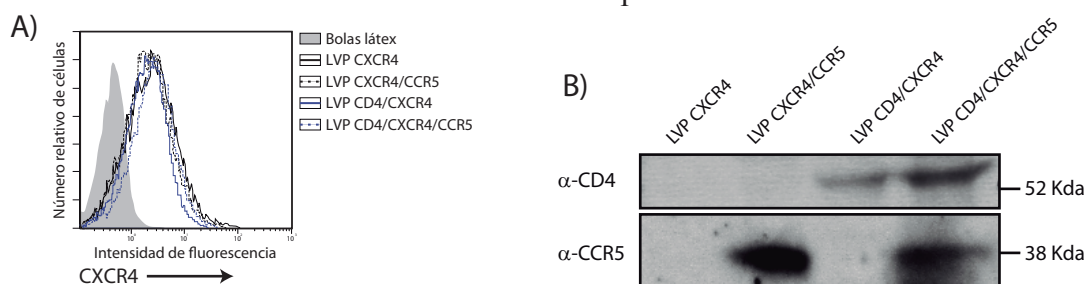


Figura 55: Caracterización de las partículas lentivirales generadas. A) Los niveles de expresión de CXCR4 fueron analizados por citometría de flujo en partículas LVCXCR4, LVCXCR4/CCR5, LVCD4/CXCR4 y LVCD4/CXCR4/CCR5 unidas a bolas de látex (4 µm). B) La expresión de CD4 y CCR5 fue analizada por western blot en partículas LVCXCR4, LVCXCR4/CCR5, LVCD4/CXCR4 y LVCD4/CXCR4/CCR5 con anti-CD4 y anti-CCR5 respectivamente.

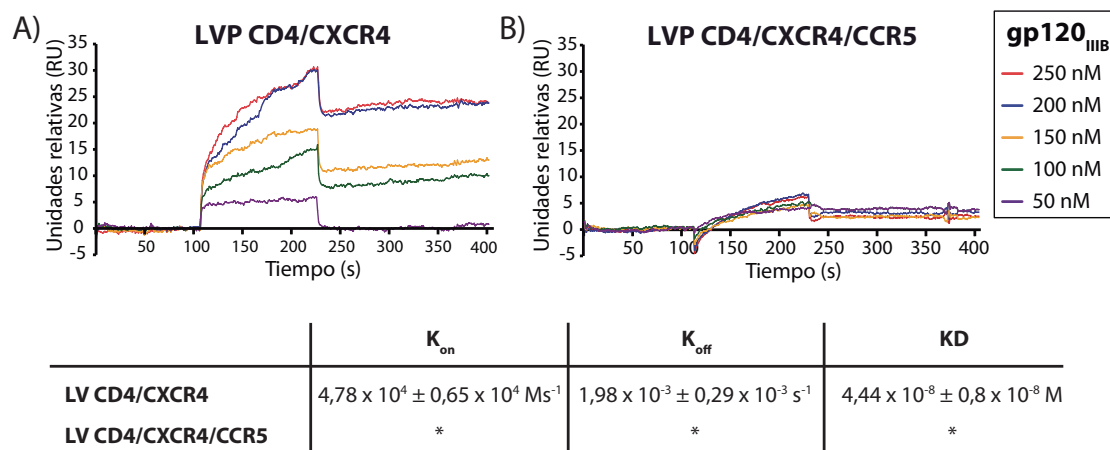


Figura 56: La coexpresión de CCR5 bloquea la unión de gp120_{IIIIB} a CD4/CXCR4. A, B) Sensorgramas de la unión de gp120_{IIIIB} (50-250 nM) a partículas A) LVCD4/CXCR4 o B) LVCD4/CXCR4/CCR5, inmovilizadas en la superficie del chip. Distintas concentraciones de gp120_{IIIIB} (50-250 nM) fueron inyectadas secuencialmente, y la unión se monitorizó en el sensorgrama como el aumento de RU. Se restaron los canales de referencia a la unión de gp120_{IIIIB} obtenida para las partículas LVCD4/CXCR4 y LVCD4/CXCR4/CCR5. Panel inferior: Tabla de las constantes de asociación (K_{on}), disociación (K_{off}) y afinidad (KD) obtenidas para la unión de gp120_{IIIIB} a las partículas LVCD4/CXCR4 y LVCD4/CXCR4/CCR5. Media \pm SEM de 3 experimentos.

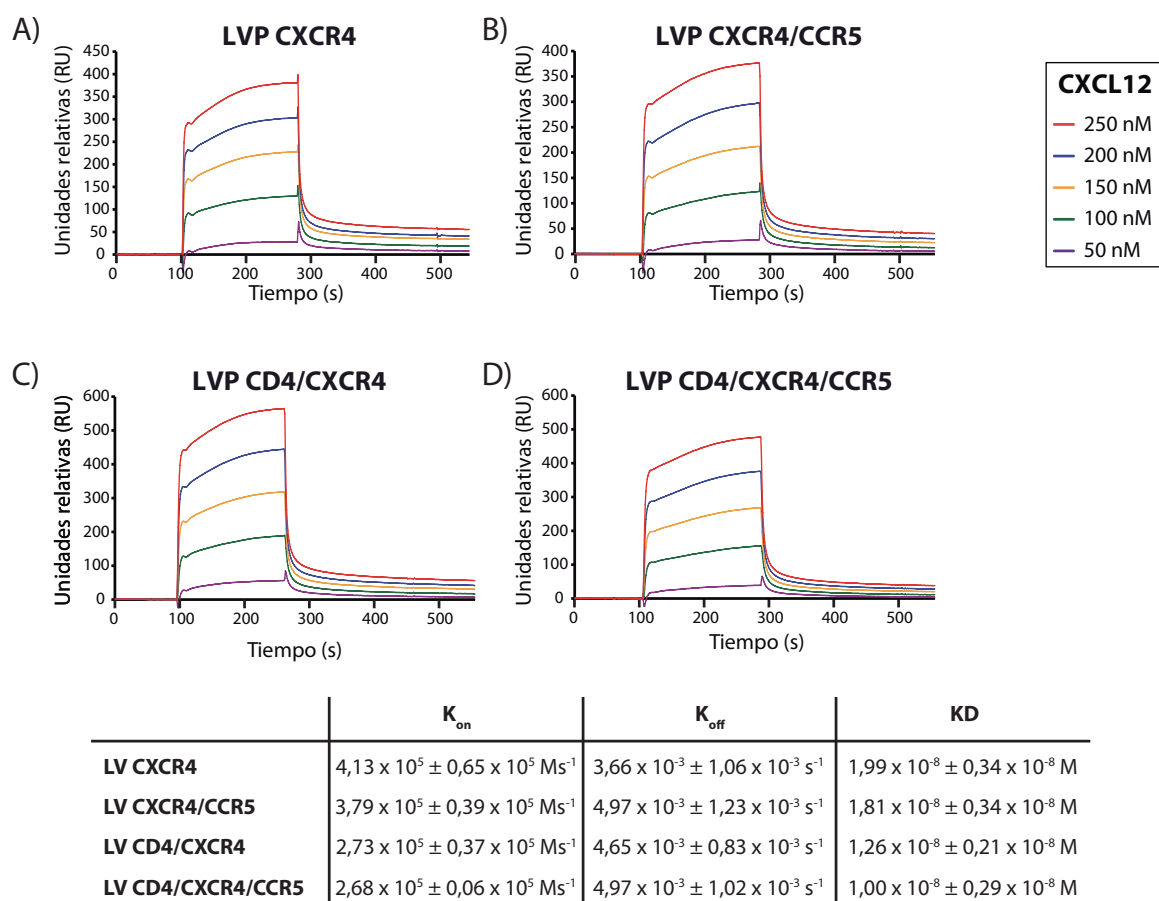


Figura 57: La coexpresión de CCR5 no afecta la unión de CXCL12. A, B, C, D) Sensorgramas de la unión de CXCL12 (50-250 nM) a partículas A) LVCXCR4, B) LVCXCR4/CCR5, C) LVCD4/CXCR4 o D) LVCD4/CXCR4/CCR5, inmovilizadas en la superficie del chip. Las distintas concentraciones de CXCL12 (50-250 nM) fueron inyectadas secuencialmente, y la unión se monitorizó en el sensorgrama como el aumento de RU, a los cuales se restaron los canales de referencia. Panel inferior: Tabla de las constantes de asociación (K_{on}), disociación (K_{off}) y afinidad (KD) obtenidas para la unión de CXCL12 a las partículas LVCXCR4, LVCXCR4/CCR5, LVCD4/CXCR4 y LVCD4/CXCR4/CCR5. Media \pm SEM de 3 experimentos.

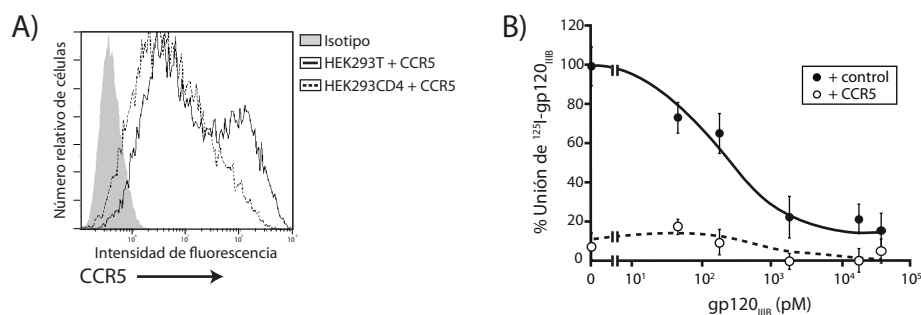


Figura 58: La coexpresión de CCR5 inhibe la unión de gp120_{IIIB} a CD4/CXCR4. A) Los niveles de CCR5 fueron analizados por citometría de flujo en células HEK293T y HEK293CD4 transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1 (control) o pcDNA3.1CCR5 (CCR5). B) Ensayos de competición de la unión de gp120_{IIIB} en células HEK293CD4 control y CCR5 fueron realizados utilizando mezclas de concentraciones de gp120 marcada (^{125}I -gp120_{IIIB}, 0,17 nM) y sin marcar (gp120_{IIIB}, 5,6 pM – 44,8 nM), midiendo como control las células HEK293T control y CCR5.

3.-Papel del citoesqueleto de actina en la oligomerización de los receptores de quimioquinas

3.1.-El citoesqueleto de actina regula la agregación de receptores CXCR4 promovida por su ligando CXCL12

Un aspecto relevante en el campo de las conformaciones de los receptores de siete dominios transmembrana, y por ende de los receptores de quimioquinas, es qué fuerzas celulares dirigen y organizan los complejos oligoméricos en la superficie celular. Uno de los primeros elementos a analizar es el citoesqueleto de actina, ya que su dinámica es modificada por la unión de las quimioquinas y resulta crítico para muchas de las funciones asociadas a estos mediadores. Decidimos para ello utilizar el receptor CXCR4, ya que sus complejos homodiméricos originan unas curvas de saturación de FRET muy estables y reproducibles. Analizamos en primer lugar el efecto que produce el tratamiento con latrunculina A (LatA), que actúa uniéndose a los monómeros de G-actina e impidiendo su unión a la F-actina. Observamos que el tratamiento no afectó a las curvas de FRET y que los valores de $FRET_{max}$ y $FRET_{50}$ fueron muy similares (Figura 41A). Estos resultados sugieren que en estado basal,

el citoesqueleto de actina no modula las conformaciones homodiméricas de CXCR4 en la superficie celular.

Nos planteamos entonces dos preguntas: 1) ¿Qué sucede con los cambios conformacionales de los complejos promovidos por los ligandos? (Levoye et al, 2009; Percherancier et al, 2005) 2) ¿Influye el citoesqueleto en ese aspecto? Realizamos entonces las curvas de saturación de FRET en células tratadas con LatA y sin tratar y estimuladas con CXCL12 (50 nM), observando que CXCL12 provoca una modificación de la eficiencia de $FRET_{max}$ que no aparece en las células tratadas con LatA (Figura 59A). Quisimos confirmar este efecto siguiendo la cinética en el tiempo del cambio conformacional que promueve CXCL12 en el complejo homodimérico CXCR4. Para ello utilizamos células HEK293T transfectadas transitoriamente a un ratio fijo de (CXCR4-YFP: CXCR4-CFP), al cual obteníamos la máxima eficiencia de FRET ($FRET_{max}$) (en el ratio que empieza la saturación de la curva). Estudiamos el efecto del estímulo con CXCL12 en células tratadas y sin tratar con LatA. El tratamiento con CXCL12 confirmó el aumento observado en el $FRET_{max}$, efecto que se bloqueó al tratar las células con LatA (Figura 59B,C). El incremento en $FRET_{max}$ se ha relacionado con un aumento en el número de complejos (Mercier et al, 2002).

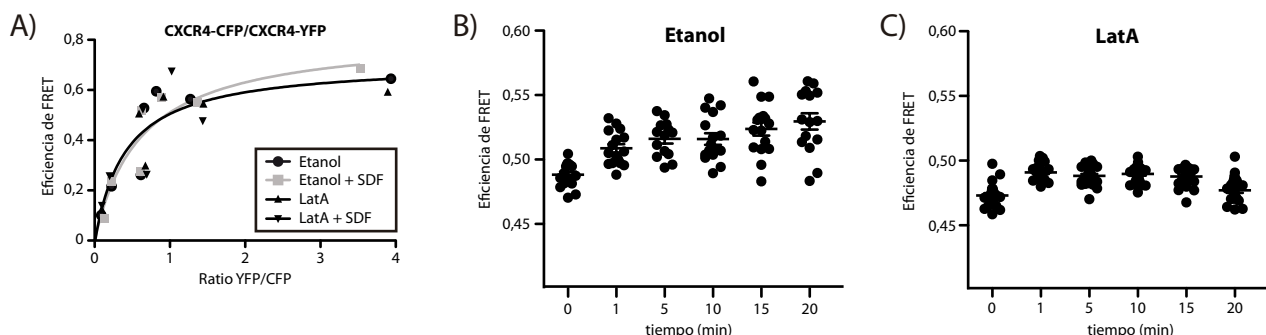


Figura 59: La inhibición de la polimerización del citoesqueleto de actina modula los cambios conformacionales de complejos homodiméricos de CXCR4 promovidos por CXCL12. A) Las curvas de saturación de FRET fueron generadas en células HEK293T que expresaban cantidades constantes de CXCR4-CFP (2 μ g, ~450.000 UF) y cantidades crecientes de CXCR4-YFP (~110.000 - 1.200.000 UF). Estas células fueron tratadas con LatA (1 μ M) o su vehículo (etanol) y estimuladas con su ligando CXCL12 (50 nM) o PBS. B, C) Se transfectaron células HEK293T con los ratios (CXCR4-YFP/CXCR4-CFP) a los que se obtuvo el $FRET_{max}$. Se trataron esas células con B) Etanol o C) LatA (1 μ M), se midió la eficiencia de FRET en ambas condiciones a diferentes tiempos de estimulación con CXCL12 (50 nM).

Para comprobar que el efecto de LatA no se debía a alteraciones en la unión de CXCL12 al receptor, realizamos un ensayo de unión de SDF-1 α biotinilado en células tratadas con LatA o con su vehículo (etanol) sin detectar diferencias en la unión por el tratamiento (**Figura 60**).

Estos datos sugieren que CXCL12 promueve la agregación de CXCR4 en la superficie celular, y que la polimerización de actina participa en el proceso.

3.2.-CXCL12 promueve internalización de CXCR4 independientemente del citoesqueleto de actina

El efecto de CXCL12 sobre la agregación de CXCR4 puede estar ligado a la inducción por parte del ligando de la internalización de CXCR4. Se sabe que las quimioquinas promueven agrupamiento e internalización del re-

ceptor, y este fenómeno podría dar cuenta del aumento en el $FRET_{max}$ observado. Estudiamos el efecto de la inhibición de la polimerización de actina sobre la internalización de CXCR4 promovida por CXCL12. Células Jurkat tratadas previamente con LatA o con su vehículo (etanol), fueron estimuladas con CXCL12 (50 nM), y mediante citometría de flujo, determinamos los niveles de CXCR4 en la membrana celular a diferentes tiempos. CXCL12 produjo un 80% de internalización de CXCR4 a los 5 minutos. Curiosamente el tratamiento con LatA, no alteró la internalización de CXCR4 (**Figura 61**).

Estos datos indican que el aumento en la eficiencia de $FRET_{max}$ promovido por CXCL12, que se inhibe por el pretratamiento con LatA, es independiente del efecto de agrupación del receptor previo a la internalización que produce el ligando, ya que este proceso no se vio afectado por el tratamiento con LatA.

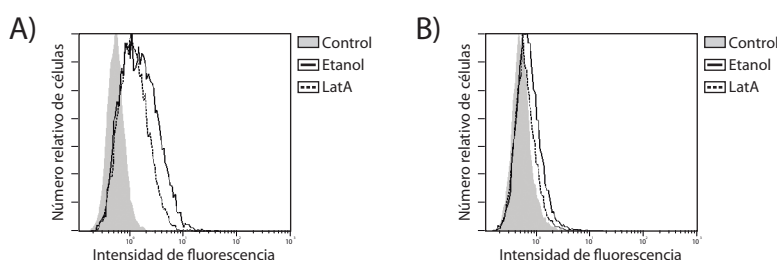


Figura 60: El bloqueo del citoesqueleto de actina no afecta a la unión de CXCL12 a CXCR4. A) Análisis por citometría de flujo de la unión de CXCL12 biotinilado a CXCR4 en células Jurkat tratadas con LatA (1 μ M) o con etanol. B) Análisis de la especificidad de la interacción en las células Jurkat tratadas con LatA (1 μ M) o etanol, utilizando CXCL12 biotinilado tratado previamente con anticuerpos bloqueantes de CXCL12.

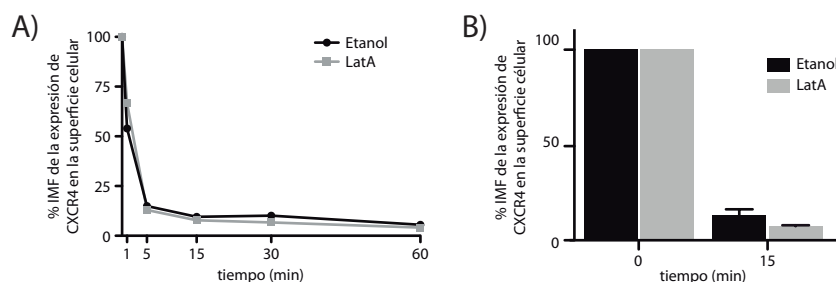


Figura 61: La internalización de CXCR4 promovida por CXCL12 es independiente del citoesqueleto de actina. A) Expresión por citometría de flujo, de los niveles de CXCR4 en la membrana de células Jurkat tratadas con LatA (1 μ M) o etanol tras la estimulación con CXCL12 (50 nM). Experimento representativo de tres realizados. B) Cuantificación del porcentaje de internalización promovido en A). Media \pm SEM de tres experimentos.

También estudiamos si el tratamiento con LatA alteraba el reciclaje de CXCR4. Tratamos previamente a las células con CXCL12 promoviendo la máxima internalización del receptor, tanto en células tratadas con LatA como con el vehículo (etanol). Seguidamente lavamos el exceso de ligando (CXCL12) y dejamos a las células durante 1 hora en cultivo a 37 °C, para después determinar el CXCR4 presente en la membrana celular y calcular así el porcentaje de receptor reciclado. El tratamiento con LatA tampoco alteró el reciclaje de CXCR4 tras su internalización (**Figura 62**).

Estos datos sugieren que el citoesqueleto de actina no afecta a la conformación de CXCR4 en la superficie celular, pero sí a los cambios conformacionales que provoca el ligando sobre dichos complejos.

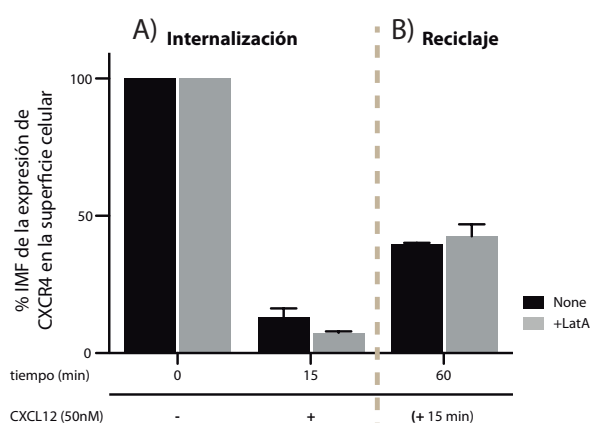


Figura 62: El reciclaje de CXCR4 no se ve afectado por la inhibición de la polimerización de actina. A) Cuantificación de la expresión por citometría de flujo de los niveles de CXCR4 en la membrana de células Jurkat tratadas con LatA (1 μ M) o etanol, tras la estimulación con CXCL12 (50 nM, 15 min), y B) después lavar las células estimuladas (15 min) 1 hora a 37 °C. Media \pm SEM de tres experimentos.

3.3.-CXCR4 se organiza en complejos en la superficie celular

Se ha monitorizado y analizado la localización espacial, movilidad y organización supramolecular de ciertos GPCRs en la membrana celular mediante el uso de microscopía basada en “total internal reflection fluorescence microscopy” (TIRF-M) (Calebiro et al, 2013).

Para discernir el efecto que el citoesqueleto de actina tiene sobre los complejos de CXCR4 en la superficie celular, se transflectaron células Jurkat con CXCR4-AcGFP y lifeact-RFP. A las 24 horas fueron sorteadas, cultivadas sobre pocillos tapizados con fibronectina (30 min, 37 °C) y filmadas bajo la óptica de TIRF-M. Inicialmente, añadimos LatA y visualizando lifeact-RFP determinamos las mejores condiciones para detectar el efecto en la polimerización de actina. Tras 15 minutos de la adición de LatA, se produce una reducción en la fluorescencia de lifeact-RFP, compatible con despolimerización de la F-actina (**Figura 63**). Este es el tiempo elegido para el resto de los experimentos.

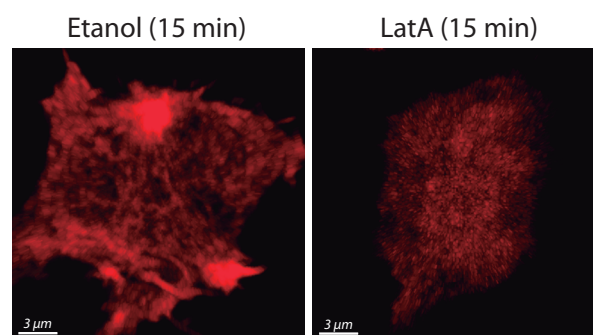


Figura 63: El tratamiento con LatA promueve despolimerización de actina. Imágenes de TIRF-M de células Jurkat transfectadas con lifeact-RFP y tratadas con etanol o LatA (1 μ M, 15 min).

A continuación focalizamos nuestro análisis en las partículas de CXCR4-AcGFP en células sin tratar con LatA. La cuantificación del área de las partículas en función de su frecuencia demostró la existencia de una distribución Gaussiana con un tamaño medio de spot de 0,5 μ m² (**Figura 64A**). Dado que los datos de FRET indicaban que la estimulación con CXCL12 promovía un aumento en el número de complejos dimericos, realizamos el mismo experimento pero tapizando los pocillos con fibronectina más CXCL12. Observamos un desplazamiento de la curva hacia la derecha y una pérdida de la homogeneidad con valores medios de 0,5; 0,8; y 1,5 μ m² (**Figura 64B**). Estos resultados apoyan a los obtenidos en FRET, es decir, CXCL12 promueve un agrupamiento de los receptores. El tratamiento con LatA no afectó al tamaño de los complejos basales de CXCR4, pero sí bloqueó el efecto de agregación promo-

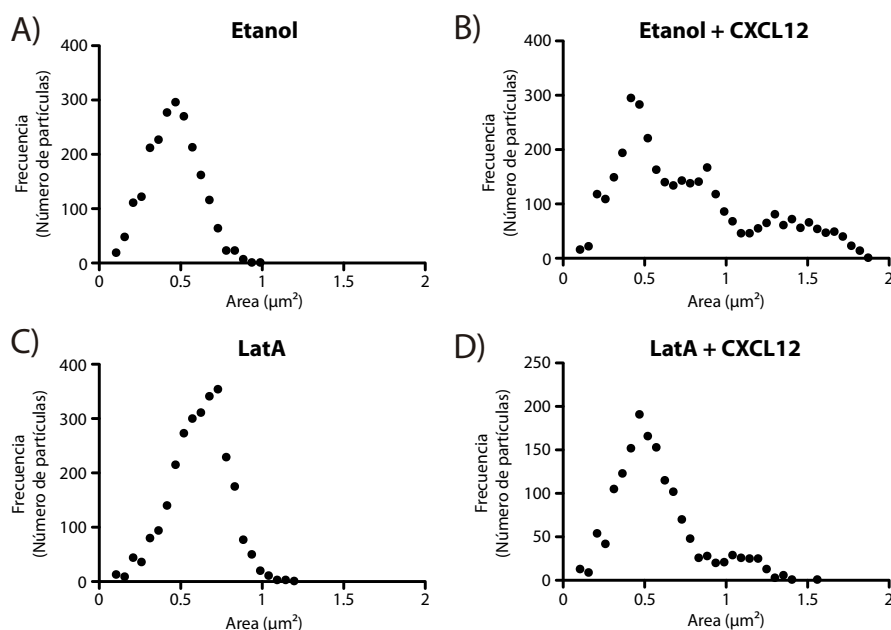


Figura 64: El aumento del tamaño de los complejos de CXCR4 promovido por CXCL12 se encuentra inhibido por el tratamiento con LatA. A, B, C, D) Análisis por TIRF-M del área de la frecuencia de partículas en función del área que ocupan en células Jurkat transfectadas con CXCR4-AcGFP, tratadas con A, B) etanol B), y estimuladas con CXCL12, o bien tratadas con C, D) LatA D) y estimuladas con CXCL12. Experimento representativo de tres realizados.

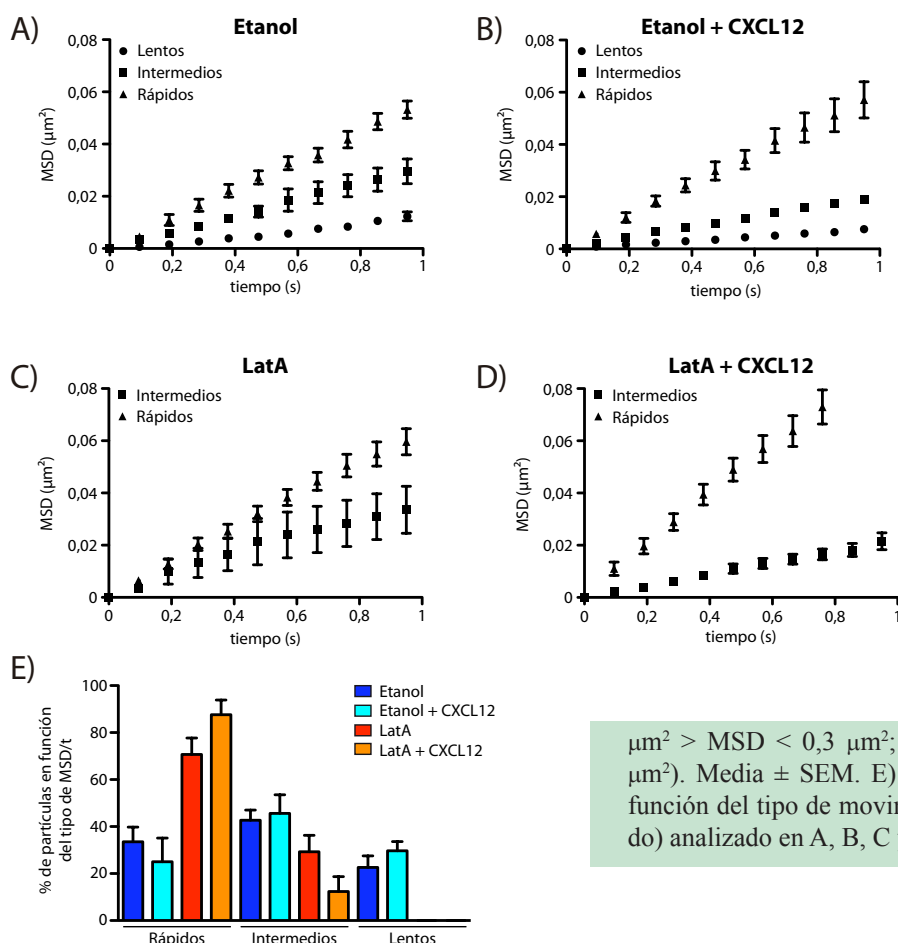
vido por CXCL12 (**Figura 64C,D**). Estos datos están en relación con lo observado en los experimentos de FRET, ya que la inhibición de la polimerización del citoesqueleto de actina con LatA no afecta al FRET_{max} de los homodímeros de CXCR4, pero inhibe el aumento de FRET_{max} promovido por CXCL12.

A continuación evaluamos el movimiento de los receptores en la superficie celular. En primer lugar analizamos el MSD (“Mean square displacement”) de cada partícula a lo largo del tiempo (durante 1 segundo, aproximadamente 10 “frames”), y obtuvimos líneas rectas con diferentes pendientes, pudiendo clasificar de esta manera 3 tipos de movimientos de los receptores; unas de movimiento lento, otras rápidas y otras intermedias (**Figura 65**).

El estímulo con CXCL12 nos permitió todavía diferenciar los tres tipos de movimientos, aunque registramos una reducción significativa del porcentaje de partículas rápidas y un aumento del porcentaje de partículas de movilidad intermedia y lenta (**Figura 65E**). Estos datos correlacionan la agrupación de CXCR4 promovida por CXCL12 con una disminución del MSD a lo largo del tiempo como previa-

mente ha sido propuesto para otros GPCR de clase A (Kusumi et al, 2005). Por otro lado, observamos que el tratamiento con LatA inhibió la presencia de partículas lentas, mientras que el porcentaje de las partículas rápidas aumentó significativamente incluso en presencia de CXCL12 (**Figura 65E**).

Aunque el efecto de drogas sobre la polimerización de la actina puede ser bastante impredecible, algunos trabajos previos usando TIRF-M demuestran que la movilidad lateral de las proteínas es mayor al despolimerizarse la actina (Treanor et al. 2010). Por este motivo estudiamos el coeficiente macroscópico de difusión para el CXCR4-AcGFP en cada condición. Los datos mostraron tres tipos de coeficientes de difusión en las células tratadas con etanol (vehículo), tanto en presencia como en ausencia de CXCL12. Mientras que en las células tratadas con LatA, tanto en presencia como ausencia de CXCL12, se perdió el movimiento más lento. Como control tapizamos un cristal con proteína verde fluorescente (AcGFP) purificada. Dado que el CXCR4 se encuentra como mínimo en forma de complejos homodiméricos, utilizamos la proteína AcGFP dimérica (ver materiales y métodos). Esta proteína



se encuentra formando dímeros estables por la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas del extremo carboxilo terminal que añadimos y, que sustituyen al codón de parada. Sorprendentemente observamos que el movimiento de la proteína AcGFP purificada presenta un movimiento similar al de las partículas más lentas. Por ello podemos considerar que las partículas de movimiento más lento son realmente inmóviles (**Figura 66**).

Posteriormente evaluamos en las células las trayectorias de las partículas en la membrana celular, pero en este caso durante al menos 10 segundos. A un movimiento intermedio-largo en el tiempo le siguen fases lentas y saltos muy rápidos que enlazan fases de movimiento uniforme. Ese tipo de movimiento se ha denominado como “hop diffusion”, y consiste en un movimiento confinado en un compartimento, seguido por un rápido salto a un compartimento adyacente, confinándose de nuevo (**Figura 67A,B**). Esta observación es muy similar a la descrita previamente para el receptor MOR (Suzuki et al, 2005). Para analizar

este tipo de movimientos y su relación con la actina, cotransfectamos las células Jurkat con CXCR4-AcGFP y lifeact-RFPm. Observamos entonces que en las zonas más densas de actina, el CXCR4 no presenta movimiento, permanece inmóvil; mientras que en zonas menos densas, que es donde se encontraría confinado, presenta un mayor movimiento. Finalmente, cuando el CXCR4 pasa a zonas con muy baja tinción de actina es cuando realiza los movimientos más rápidos y de mayor desplazamiento (**Figura 67C**).

Nuestras observaciones demuestran que el confinamiento, y por lo tanto la restricción del movimiento es mucho menor en células tratadas con LatA.

Todos estos datos indican que el citoesqueleto de actina influye en la dinámica de CXCR4 en la membrana celular definiendo las barreras que limitan su movimiento y la agrupación de los mismos promovida por el ligando.

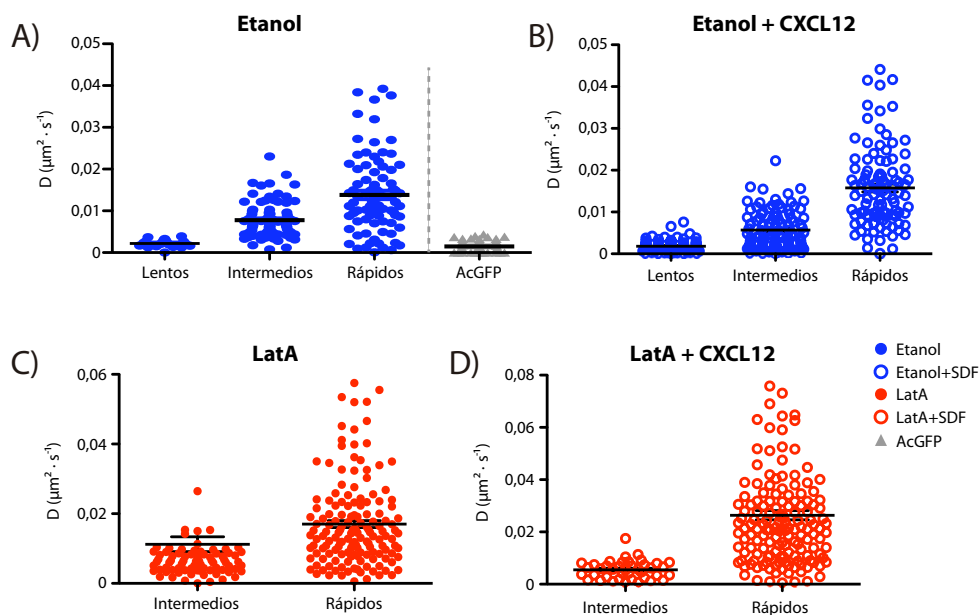


Figura 66: Evaluación del coeficiente de difusión de los complejos de CXCR4 en la superficie celular. Análisis del aumento del coeficiente de difusión (D), observado por TIRF-M, de los complejos homodiméricos de CXCR4 en función del tipo de movimiento (lento intermedio y rápido), en células Jurkat transfectadas con CXCR4-AcGFP, tratadas con A, B) etanol B), y estimuladas con CXCL12, o bien tratadas con C, D) LatA D) y estimuladas con CXCL12. Experimento representativo de tres realizados. (Spots lentos: $\text{MSD} < 0,1 \mu\text{m}^2$; spots intermedios: $0,1 \mu\text{m}^2 > \text{MSD} < 0,3 \mu\text{m}^2$; spots rápidos: $\text{MSD} > 0,3 \mu\text{m}^2$). Media \pm SEM.

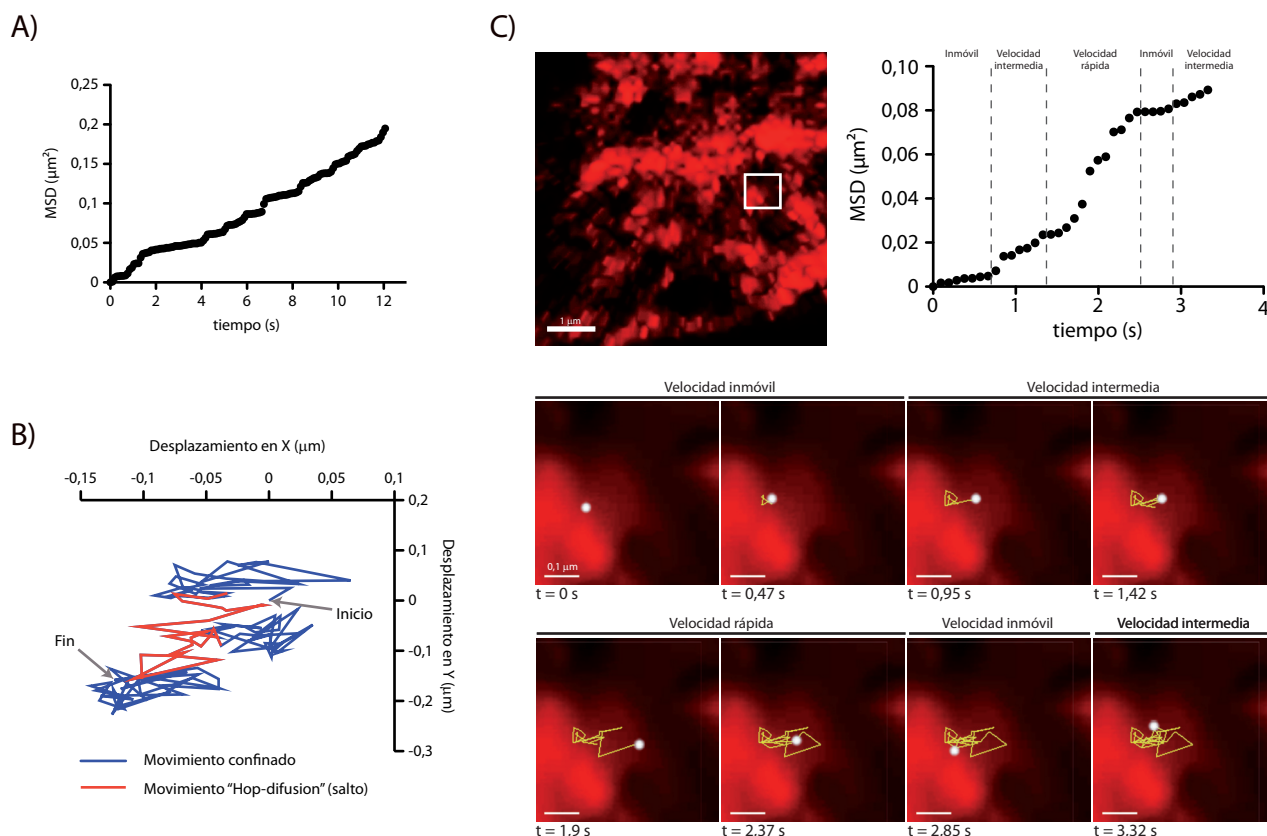


Figura 67: Los complejos de CXCR4 presentan un movimiento "hop diffusion". En células Jurkat electroporadas con CXCR4-AcGFP fue estudiado el dinamismo de sus complejos mediante la técnica de TIRF-M. A) Trayectoria de una partícula de CXCR4 ($\text{MSD}(\mu\text{m}^2)/t(\text{s})$) a largo del tiempo (12 s). B) Recorrido de la partícula presentado en A. C) En células Jurkat electroporadas con CXCR4-AcGFP y lifeact-RFPm, seguimos la trayectoria de una partícula de CXCR4 en una zona rica en actina a lo largo del tiempo. En función del MSD clasificamos los distintos tipos de movimiento de CXCR4 (inmóvil, intermedio y rápido).

3.4.-La alteración del citoesqueleto de actina modula las funciones mediadas por CXCL12

Para determinar la relevancia funcional de la agrupación y compartimentalización del receptor (CXCR4) en la superficie celular, estudiamos la movilización de calcio intracelular promovida por CXCL12 en células tratadas con LatA o con el vehículo. Observamos que las células tratadas con el vehículo responden a CXCL12 movilizando calcio hasta alcanzar la máxima respuesta a 50 nM. Sin embargo en las células tratadas con LatA la movilización de calcio intracelular es menor a todas las concentraciones de CXCL12 utilizadas (**Figura 68**).

Estudiamos entonces la capacidad para activar la proteína G. Utilizamos membranas celulares preparadas a partir de células Jurkat tratadas con LatA, o con el vehículo (etanol), y observamos que el CXCL12 promueve un aumento de la unión máxima de GTP- γ S significativamente menor (E_{\max}) y desplazada a la derecha (EC_{50}) en las células tratadas con LatA (**Figura 69**). Estos resultados indican que la inhibición de la polimerización de la actina altera tanto la eficacia relativa como la eficacia máxima de CXCL12 para activar la proteína G, reduciendo tanto el máximo nivel de activación, como la concentración de CXCL12 requerida para promover la mitad de activación.

Todos los resultados indican que CXCL12 promueve la agregación del receptor para alcanzar un umbral de respuesta, y que el citoesqueleto de actina juega un papel crítico en el proceso.

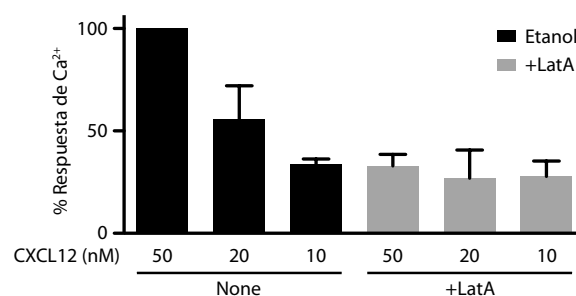
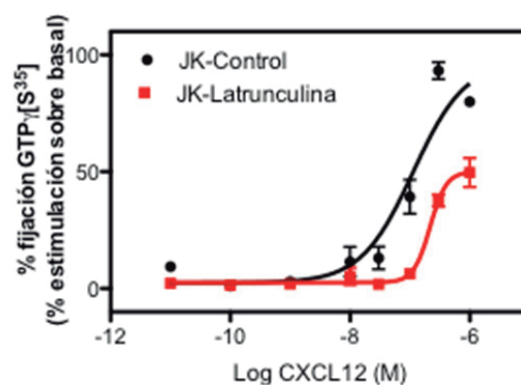


Figura 68: El tratamiento con LatA reduce la movilización intracelular de calcio promovida por CXCL12. Cuantificación de la respuesta de Ca^{2+} detectada por citometría de flujo, promovida por distintas concentraciones de CXCL12 (50, 20 y 10 nM) en células Jurkat tratadas con etanol o LatA. Media \pm SEM de 3 experimentos.



	EC_{50} (nM)	E_{\max}
JK-Control	114 \pm 27	100
JK-Latrunculina A	345 \pm 37,5	64,48 \pm 3

Figura 69: Efecto del tratamiento con LatA en la unión de [³⁵S]-GTP γ S promovida por CXCL12 en membranas procedentes de células Jurkat. Unión de [³⁵S]-GTP γ S promovida por CXCL12 (1pM-1 μ M) en membranas de células Jurkat tratadas con etanol (¢) o con LatA (1 μ M, £). La unión no específica fue determinada analizando la unión de [³⁵S]-GTP γ S en presencia de 10 μ M de GTP γ S no marcado. Medias \pm SEM de al menos 3 experimentos (triplicados).

V.-DISCUSIÓN

V.-DISCUSIÓN

Aunque algunos trabajos demuestran que “*in vitro*” los receptores de la familia de GPCRs funcionan como monómeros (Bayburt et al, 2011; Ernst et al, 2007; Kuszak et al, 2009), el uso de técnicas de imagen y de transferencia de energía resonante demuestra que los receptores de siete dominios transmembrana forman homo- y heterodímeros desde su síntesis y maduración en el retículo endoplásmico (Hamatake et al, 2009; Hernanz-Falcon et al, 2004; Percherancier et al, 2005). Estos complejos son estructuras dinámicas, que se modulan por la expresión de otro receptor o por la unión al ligando (Martinez Munoz et al, 2009). De hecho, distintos grupos han demostrado que los ligandos modulan las conformaciones de los receptores que ocupan, y algunos incluso las de otros receptores cercanos. El modelo más aceptado hoy es que los receptores de quimioquinas forman parte de complejos homo- y heterodiméricos en el contexto de plataformas sobre la superficie celular, de tal modo que reaccionan ante la unión de su ligando específico, pero también se ven modificados cuando se expresan otros receptores o cuando receptores vecinos resultan activados por sus respectivos ligandos. En estas condiciones el gran debate se centra hoy en conocer la relevancia funcional de estas conformaciones, como son moduladas por receptores y ligandos, y cuales son las fuerzas celulares que regulan su dinámica. En todo caso nadie pone en duda que la dimerización de estos receptores amplía la diversidad farmacológica asignada a los mismos, y podría en un futuro no lejano ayudar al desarrollo de nuevas

terapias para tratar muchas patologías en que las quimioquinas tienen un papel determinante.

En este trabajo nos hemos propuesto: Evaluar la relevancia funcional de los heterodímeros usando dos modelos. Por un lado, el papel modulador de EBI2 en la migración de los linfocitos B vía CXCR5, y por otro el papel de CCR5 como inhibidor de la infección de cepas X4 del VIH-1. Además hemos analizado las fuerzas celulares que controlan la formación y/o la estabilización de estas conformaciones en la membrana, y su dinamismo.

1.Relevancia funcional de las diferentes conformaciones adoptadas por los receptores de quimioquinas y otros GPCRs:

1.1.Papel modulador de EBI2 en la migración de los linfocitos B vía CXCR5

EBI2 es un GPCR necesario para la respuesta temprana de anticuerpos, y se le ha relacionado con enfermedades inflamatorias y neoplasias (Aalto et al, 2001; Alizadeh et al, 2000; Heinig et al, 2010; Ye et al, 2003). En condiciones homeostáticas, la expresión de EBI2 aumenta durante la maduración de los linfocitos B en médula ósea, y es además expresado por células maduras recirculantes tanto en médula

ósea, como en bazo y ganglios linfáticos (Pereira et al, 2009). EBI2 juega un papel clave en el posicionamiento de los linfocitos B en los folículos linfoides y en varias fases de la respuesta inmune adquirida como son el posicionamiento de las células B en zonas extrafoliculares de los ganglios o el desarrollo de la respuesta de anticuerpos dependiente de células T (Gatto et al, 2009; Pereira et al, 2009).

Recientemente se ha descrito que EBI2 responde específicamente a un metabolito del colesterol, $7\alpha,25\text{-OHC}$, que induce entonces “*in vitro*” migración de células B, T y dendríticas derivadas de médula ósea (Hannedouche et al, 2011; Liu et al, 2011). El efecto es específico, y de hecho el pretratamiento con un inhibidor de la síntesis de $7\alpha,25\text{-OHC}$ (CYP7B1) o la deficiencia de las enzimas encargadas de dicha síntesis, provoca “*in vivo*” una respuesta similar a la observada en células B deficientes para EBI2 (Hannedouche et al, 2011; Liu et al, 2011). Nuestros ensayos han demostrado que tanto en células transfectantes como en células B primarias activadas con $\alpha\text{-IgM}$ y en ausencia de $7\alpha,25\text{-OHC}$, que la coexpresión de HA-EBI2 reduce las respuestas funcionales mediadas por CXCR5. Independientemente de que EBI2 sea un receptor funcional y que una vez activado promueva determinadas acciones, nuestros datos indican que su sola coexpresión ejerce un papel modulador de las funciones atribuidas a CXCR5, debido a la formación de complejos heterodiméricos.

Numerosos estudios han demostrado que los receptores de quimioquinas son expresados como dímeros en la membrana plasmática (Hernanz-Falcon et al, 2004; Martinez Munoz et al, 2009), de hecho la reciente cristalización de CXCR4 ha demostrado también su dimerización (Wu et al, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la dimerización no ocurre solo entre receptores de quimioquinas, sino que estos son capaces también de interactuar con otros GPCRs, como es el caso de CCR5 y CXCR4 con receptores de opioides (Pello et al, 2008; Szabo et al, 2003) o de un gran número de receptores de quimioquinas (CCR6, CCR7, CXCR4, CXCR5, CXCR7...) con receptores codificados por virus como BILF1 (Vischer et

al, 2008). En todos los casos la función de los receptores se ve alterada. Usando técnicas de FRET hemos demostrado la formación de complejos homo- y heterodiméricos de CXCR5 y EBI2. Por otro lado estos complejos no son estructuras fijas, sino dinámicas, hemos observado que la coexpresión de HA-EBI2 reduce la afinidad aparente (FRET_{50}) de los homodímeros CXCR5, sin afectar al número de complejos homodiméricos en la célula, lo que sugiere que la presencia de EBI2 promueve un cambio conformacional de los complejos CXCR5/CXCR5.

Por otro lado, homo- y heterodímeros de CXCR5 y EBI2 son modulados por la presencia de ligandos. En los ensayos de internalización observamos en células que coexpresan ambos receptores una rápida internalización de CXCR5 o HA-EBI2 en respuesta a sus ligandos CXCL13 ó $7\alpha,25\text{-OHC}$, respectivamente, mientras que el receptor no activado en cada caso se mantiene en la membrana. Pudiera ocurrir que sólo el homodímero correspondiente se internalizara o que el heterodímero se rompiera para permitir la internalización del receptor activado. En cualquier caso, es evidente que la presencia de ligandos modula el equilibrio de receptores en la superficie de la célula B, y en consecuencia también las funciones atribuidas a ellos.

Por otro lado, también hemos observado que tanto CXCR5 como HA-EBI2 presentan la misma cinética de internalización en respuesta a sus respectivos ligandos en células que expresan uno o ambos receptores, demostrando que la internalización de CXCR5 no se ve afectada por la coexpresión de EBI2, ni al revés.

En células transfectantes o en células B primarias de ratón activadas con αIgM , observamos una modulación de las respuestas mediadas por CXCR5 al coexpresarse EBI2, ya que se redujo la movilización de Ca^{2+} intracelular, la fosforilación de ERK1,2 y la migración promovida por CXCL13. Sin embargo, la activación de células B deficientes en EBI2 no modificó las respuestas a CXCL13. Estos datos demuestran que la heterodimerización modula la respuesta por los receptores individua-

les. Este fenómeno ha sido descrito para otros GPCRs codificados por virus, como es el caso de BILF1 que heterodimeriza con CXCR4 produciendo el bloqueo de la función de la quimioquina CXCL12 (Nijmeijer et al, 2010), o el caso de CXCR4/CXCR7 donde la respuesta celular también es modulada (Levoye et al, 2009; Sierro et al, 2007), como consecuencia del heterodímero.

En el caso de la heterodimerización de CCR5 y CXCR4 con receptores opioides, se ha descrito una transinhibición producida por fenómenos de desensibilización heteróloga (Pello et al, 2008; Szabo et al, 2003), como consecuencia de la fosforilación del receptor de quimioquinas promovida por el opioide que reduce la activación de $G_{\alpha i}$ promovida por la quimioquina (Chen et al, 2004). Nosotros no encontramos una desensibilización heteróloga clara, y de hecho vimos que las células CXCR5/HA-EBI2 responden de forma similar a CXCL13 antes y después de ser estimuladas con $7\alpha,25\text{-OHC}$, y a la inversa.

Algunos estudios han demostrado que la heterodimerización de ciertos GPCRs puede afectar a la unión de ligandos, como es el caso del receptor de melatonina (MT1) y el receptor huérfano (GPR50), cuya heterodimerización reduce la afinidad de la melatonina por su receptor un 30%, y en consecuencia se producen defectos en la producción de IP3 dependiente de melatonina (Levoye et al, 2006). La heterodimerización de los receptores opioides κ y δ también reduce la afinidad por sus ligandos (Jordan & Devi, 1999). Nuestros resultados, utilizando un biosensor (Biacore) y la generación de partículas lentivirales que incor-

poran en su membrana los receptores CXCR5 y/o CXCR5/HA-EBI2, indican que la presencia de HA-EBI2 reduce significativamente la afinidad de CXCL13 por CXCR5. Lo más probable es que la reducción en la afinidad de CXCL13 cuando EBI2 es coexpresado sea consecuencia del cambio conformacional que se produce en el complejo CXCR5/CXCR5 al formarse heterodímeros EBI2/CXCR5. Sin embargo, no podemos descartar que el cambio conformacional promovido por EBI2 en CXCR5, cambie también la afinidad de la proteína G o el número de sitios a los que pueda unirse ésta. Nuestros datos indican que hay un número menor de sitios de unión de proteína G, sin embargo mantienen su afinidad por unirse al receptor CXCR5. De hecho, en condiciones limitantes de proteína G, la unión de ligandos específicos de un receptor puede selectivamente modificar la capacidad de otros receptores para activar esa proteína G (Chabre et al, 2009). Esta situación no parece ser posible aquí, ya que hemos medido la asociación y activación de la proteína G en respuesta a CXCL13 en ausencia de $7\alpha,25\text{-OHC}$.

El movimiento de las células B en el folículo linfoide es consecuencia de la integración de múltiples señales. Inicialmente su movimiento en búsqueda de antígenos depende de CXCR5. En el modelo que proponemos la célula B naïve espresará fundamentalmente homodímeros de CXCR5 que tras su unión a CXCL13, expresado por las células estromales, activará la proteína $G_{\alpha i}$ y su consecuente señalización. Sin embargo, la captura del antígeno a través del BCR promueve la rápida expresión de EBI2 (Gatto et al, 2009; Kelly et al, 2011), a la vez que también aumenta la expresión de CCR7. En esas condiciones, la célula B acti-

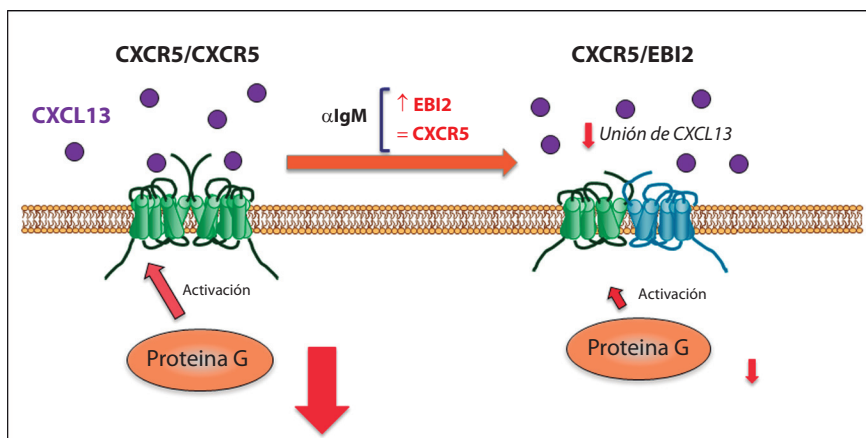


Figura 70: Modelo propuesto para la modulación de las respuestas mediadas por CXCL13 por la coexpresión de EBI2.

vada deja de responder a CXCL13; fenómeno que podemos explicar con nuestros resultados, ya que el aumento en los niveles de expresión de EBI2 desplaza el equilibrio de homodímeros CXCR5/CXCR5 a heterodímeros CXCR5/EBI2 modificando la afinidad de CXCL13 por su receptor y la afinidad de la proteína G α i (**Figura 71**). Como consecuencia, la función de CXCR5 está modulada por la coexpresión de EBI2 en la célula B activada. En ese momento, la célula B es capaz de dirigirse a la zona T guiada por CCL19 y CCL21. Por lo tanto, el heterodímero CXCR5/EBI2 contribuye a la plasticidad funcional de las células B.

Estos datos ayudan a entender cómo las diferentes etapas de la migración de las células B son finamente reguladas, tanto por la expresión de los receptores, demostrando la relevancia funcional de los complejos heterodiméricos, como de sus ligandos.

1.2. Papel de CCR5 como inhibidor de la infección de cepas X4 del VIH-1

Otro modelo en el que hemos estudiado la relevancia funcional de las conformaciones adoptadas por los receptores de quimioquinas es en la infección del VIH-1.

Nuestros datos indican que cuando coexisten en las células CD4, CXCR4 y CCR5 forman complejos oligoméricos, y lo que es más importante, la expresión de CCR5 modifica la conformación tanto del homodímero CXCR4/CXCR4 como del heterodímero CD4/CXCR4. Como consecuencia la proteína viral gp120_{IIIb} no se une a CD4 y a su coreceptor, bloqueando la infección celular. No es la primera vez que se ha descrito que las conformaciones heterodiméricas modulan la capacidad de los receptores de quimioquinas para unir sus ligandos. CXCR7 heterodimeriza con CXCR4 y modula la capacidad de CXCL12 para activar proteína G α i (Decaillet 2001 and Levoe 2009), y en nuestro caso hemos demostrado cómo la formación de complejos CXCR5/EBI2 reduce la afinidad de CXCL13 por CXCR5 (Barroso et al, 2012).

La eficiencia en la infección de cepas X4 y R5 del VIH-1 no sólo depende de los niveles de expresión de CD4 (Lee et al, 1999), sino también de los niveles de sus correceptores CXCR4 y CCR5, respectivamente (Lapham et al, 1999). Aunque algunos estudios sugieren que existe un umbral en el ratio receptor/correceptor para la entrada del virus (Kabat et al, 1994; Kozak et al, 1997; Platt et al, 1998), nuestros datos demuestran que a pesar de mantener establemente ese umbral de CD4/CXCR4 (los niveles de ambos receptores se mantienen constantes durante la experimentación) existe una reducción en la infección del virus X4 en células que coexpresan CCR5, y además es dependiente de los niveles que la célula coexpresase. Platt y colaboradores observaron en dos cepas distintas de virus X4 primarios (ELI1 y K4) que infectaban en menor medida células HeLa-CD4 cuando coexpresaban CCR5 (Platt et al, 1998). La mutación del gen CCR5 Δ 32 (deleción de un segmento de 32 pb que da lugar a un receptor no funcional) confiere protección frente a la infección por cepas R5 del VIH-1. Esta mutación pierde su efectividad cuando los virus R5 cambian a X4, es más, se ha observado una mayor replicación del virus VIH-1_{NL4-3} en PBMCs de individuos heterocigotos CCR5 Δ 32 (Trkola et al, 2002). Otro estudio realizado por Schonning y colaboradores demostró como en un 75% de individuos heterocigotos CCR5 Δ 32 infectados por virus X4/R5 la enfermedad progresaba lentamente y presentaban una mayor carga viral que individuos CCR5 homocigotos y que además no desarrollaban la enfermedad (Schonning et al, 1998).

Las cepas R5 del VIH-1 son en su mayoría las responsables de la primera infección en individuos sanos, y por tanto de la fase aguda y asintomática de la enfermedad (Haynes et al, 1996; Salk et al, 1993). En estas primeras etapas de la enfermedad, los virus R5 infectan a células Th1, que expresan altos niveles de CCR5 en su membrana (Bonecchi et al, 1998; Loetscher et al, 1998). Estas cepas R5 mutan a X4, y esto se ha asociado a una aceleración del síndrome y a una infección de las células Th2, provocando una degeneración del sistema inmunológico (Tersmette et al, 1988; Zhu et al, 1993). Nuestros datos explican por qué los

virus X4 infectan mayoritariamente a células Th2, que expresan bajos niveles de CCR5, y no lo hacen en células Th1 a pesar de mantener niveles similares de CD4 y CXCR4 (Gosselin et al, 2010; Rivino et al, 2004). La expresión de CCR5 está modificando las conformaciones CD4/CXCR4, inhibiendo la unión de la proteína gp120, responsable de la primera interacción del virus con la célula diana y por tanto de la infección.

La unión de ligandos a sus receptores promueve cambios conformacionales en estos (Percherancier et al, 2005), y lo mismo sucede con la gp120_{IIIb}. Su unión a CD4 promueve un cambio conformacional en ella misma exponiendo un dominio de unión (CD4 induced domain) necesario para unirse al correceptor (Hartley et al, 2005; Rizzuto et al, 1998). Nuestros datos, mediante BRET, demuestran que la unión de gp120_{IIIb} promueve un cambio conformacional en el heterodímero CD4/CXCR4, que es inhibido al coexpresarse CCR5.

Los primeros eventos señalizadores promovidos por la unión de la gp120 a sus receptores implicados en la entrada del virus, son la activación de LIMK-1 y la fosforilación de cofilina, lo que a su vez actúa sobre el citoesqueleto de actina (Vorster et al, 2011; Yoder et al, 2008) y permite la fusión y entrada del virus. Ambos eventos son inhibidos cuando CCR5 es coexpresado. El efecto es específico

para las proteínas virales porque nuestros datos indican que la expresión de CCR5 no afectó ni a la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4, ni a la señalización activada en consecuencia. Es muy probable que en los complejos CD4/CXCR4/CCR5 el epítipo implicado en la unión de gp120_{IIIb} esté oculto, mientras que CXCL12 es capaz de unirse a su receptor.

Los complejos homo y heterodiméricos se encuentran en equilibrio en la célula T CD4⁺. En esas condiciones la gp120 del virus se une al CD4 de la célula hospedadora, lo que origina cambios conformacionales tanto en el receptor como en la propia gp120, que expone sus dominios (dominio inducido por CD4 y hélice V3) permitiendo su posterior interacción con CXCR4. La unión de la gp120 al complejo CD4/CXCR4 activa transitoriamente a LIMK-1, que a su vez fosforila la cofilina permitiendo de esta manera la polimerización de actina y el agrupamiento de CD4/CXCR4. A esta fase, le sigue una desfosforilación de la cofilina que promueve despolimerización de actina necesaria para la entrada del virus en la célula huésped. Se ejerce así un efecto sobre la dinámica de la actina clave en las primeras fases de la infección viral. La coexpresión de CCR5 origina complejos oligoméricos CD4/CXCR4/CCR5 que promueven cambios conformacionales tanto en CXCR4/CXCR4 como en CD4/CXCR4, e impiden la unión de gp120_{IIIb} a los receptores y la consecuente infección (**Figura 72**).

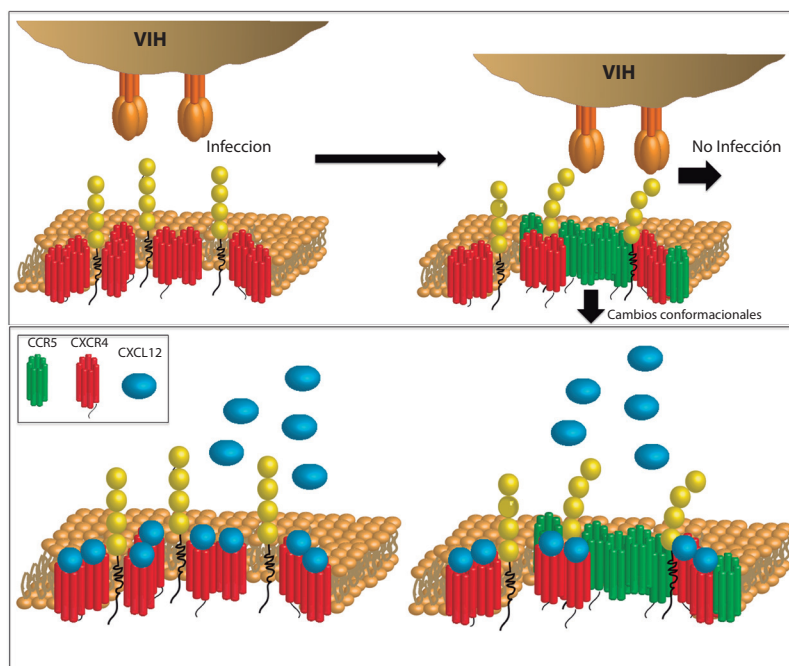


Figura 71: Modelo propuesto para la modulación de la infección de cepas X4 del VIH-H por la coexpresión de CCR5. Panel superior: cambio conformacional de CXCR4 promovido por la coexpresión de CCR5 que impide la infección del VIH-1. Panel inferior: El cambio conformacional de CXCR4 promovido por la coexpresión de CCR5 no afecta a la unión de CXCL12.

Los datos aportados en este estudio resaltan la importancia de la oligomerización de receptores como dianas potenciales para el tratamiento del SIDA. El cambio de cepas R5 a cepas X4 del virus tiene una relevancia clínica importante, ya que se asocia a la pérdida masiva de células T CD4⁺ y al desarrollo de la enfermedad, sin embargo, hoy en día no existen antagonistas efectivos para las cepas X4. Estos datos abren la posibilidad de generar nuevos compuestos que permitan mimetizar el cambio conformacional de los complejos promovido por CCR5 permitiendo así bloquear la infección de cepas X4 del VIH-1, sin alterar las respuestas funcionales de CXCR4.

2. Papel que juega el citoesqueleto de actina en la formación de los complejos oligoméricos de los receptores de quimioquinas:

Algunos trabajos mantienen que los receptores pertenecientes a la familia de GPCRs pueden actuar como monómeros (Bayburt et al, 2011; Ernst et al, 2007; Kuszak et al, 2009), sin embargo existen muchas evidencias de que forman complejos homo- y heterodiméricos e incluso entidades oligoméricas mayores. Los complejos existen en la superficie celular en ausencia de ligandos, y además se forman durante su síntesis y maduración (Hamatake et al, 2009; Hernanz-Falcon et al, 2004; Percherancier et al, 2005). No obstante, hasta el día de hoy se desconoce si la formación de estos complejos y su presencia en la superficie celular está regulada por otras proteínas, y cuál es su mecanismo de acción.

Es cierto que se conoce que las quimioquinas promueven la agregación de los receptores como paso previo a su internalización (Levoye et al, 2009; Percherancier et al, 2005), y nosotros detectamos mediante técnicas de FRET y TIRF-M, que CXCL12 promueve la agregación de CXCR4. Esta agregación de los receptores es mediada por el citoesqueleto de actina, ya que al tratar las células con la-

trunculina A (LatA) se bloquea. Sin embargo, la internalización de CXCR4 no está afectada (al tratar las células con LatA). Curiosamente, algunos trabajos anteriores realizados con el receptor β -adrenérgico (Angers et al, 2000) o con receptores purificados (Fung et al, 2009) han demostrado que los ligandos no afectan a la oligomerización de los receptores. El efecto de agregación de CXCR4 en la membrana promovido por CXCL12 es similar al detectado para el receptor GABA_B (Calebiri et al, 2013). Dado el papel que el citoesqueleto de actina tiene en muchas de las funciones asociadas a los receptores de quimioquinas, decidimos evaluar si también está implicado en la organización de estos receptores en la superficie celular y en su movilidad. Los datos de FRET, en presencia de un inhibidor de la polimerización de actina (Latrunculina A), revelaron que el citoesqueleto de actina no afectaba a la oligomerización de CXCR4, pero si eliminaba el proceso de agregación promovido por CXCL12.

Algo similar fue también detectado por TIRF-M, latrunculina A no afectó a la agregación inicial de CXCR4, pero también redujo la coalescencia de receptores promovida por CXCL12. Se sabe que las quimioquinas promueven agrupación del receptor previa a la internalización, lo que podía explicar la agrupación de los receptores promovida por CXCL12. Era lógico pensar que la inhibición del citoesqueleto de actina podría afectar a la internalización, y ser esa la razón por la que la agregación no se veía en presencia de latrunculina A. Sorprendentemente, nuestros estudios demostraron que la inhibición del citoesqueleto de actina no afectaba a la internalización de CXCR4 mediada por CXCL12, que seguía produciéndose de manera natural en presencia de latrunculina A. Los datos indican que el citoesqueleto de actina juega un papel clave en la movilidad de los receptores sobre la superficie celular, y que se trata de un proceso independiente al proceso de internalización. Además de la internalización, el bloqueo de la polimerización de actina tampoco alteró el proceso de reciclaje del receptor a la membrana celular.

Los experimentos de TIRF-M también nos permiten analizar el coeficiente macros-

cópico de difusión de los receptores y detectar que no es uniforme. De hecho hay receptores que presentan movimientos muy lentos, otros más rápidos e incluso un tercer movimiento con velocidad intermedia.

De hecho el patrón de difusión coincide con el descrito para otros receptores, el denominado “hop-diffusion” (Kusumi et al, 2005). El receptor está confinado en un compartimento de la membrana que está definido por proteínas transmembrana ligadas al citoesqueleto de actina, pero al moverse puede saltar a otro compartimento adyacente donde vuelve a quedar temporalmente atrapado (Kusumi et al, 2005). Nuestro estudio revela que el movimiento intermedio corresponde a los receptores confinados en un compartimento, mientras que el movimiento más rápido se produce cuando el complejo salta a un compartimento adyacente, por otro lado los receptores más lentos, casi fijos, se localizan en las zonas con actina polimerizada. Estos datos concuerdan con los descritos previamente para otro GPCR como es el receptor MOR (Suzuki et al, 2005).

El tratamiento con CXCL12 parece no alterar en demasía el patrón de movimiento, pero si redujo el número de receptores con movimiento rápido y aumentó el número de los lentos, lo que en combinación con los datos de FRET indicarían que el agrupamiento de receptores disminuye su capacidad de movimiento en función de su mayor tamaño.

Nuestros datos de TIRF-M en células tratadas con latrunculina A demuestran que aunque la actina no participe en la formación de los complejos, si modula la difusión de los receptores. Observamos que las células tratadas con el inhibidor presentan un patrón de movimiento que en la mayoría de las veces no coincide con el “hop-difusion”, y el número de receptores con velocidad lenta disminuye significativamente. Estas evidencias sugieren fuertemente que el efecto se debe a la ausencia de polimerización de actina, y por lo tanto indica que el citoesqueleto de actina es clave para la dinámica de CXCR4 en la membrana celular. El modelo concuerda con el descrito para otras

proteínas de la superficie celular (Treanor et al, 2010; Wheeler et al, 2007).

En algunos casos la “compartimentalización” de los receptores en la membrana afecta su funcionalidad, así ocurre por ejemplo en el caso del receptor de células B (Mattila et al, 2013). También se observa en el caso del CXCR4, donde detectamos menor movilización de calcio en respuesta a diferentes concentraciones de CXCL12 en células tratadas con latrunculina A, y también menor capacidad de activación de la proteína G α i.

Demostramos la importancia de la agregación del receptor CXCR4 y compartimentalización en distintos ensayos funcionales, observando que el tratamiento con LatA reduce la movilización del calcio intracelular en respuesta a diferentes concentraciones de CXCL12. Confirmamos este efecto al estudiar la activación de la proteína G, donde demostramos que el tratamiento con LatA reduce la activación promovida por CXCL12 a cualquier concentración.

3.-Discusión global:

Aunque algunos estudios justifican la existencia de monómeros de GPCRs capaces de activar proteínas G (Bayburt et al, 2011; Ernst et al, 2007; Kuszak et al, 2009), técnicas basadas en transferencia de energía resonante han dejado claro la existencia de complejos oligoméricos de estos receptores en la superficie celular en ausencia de ligandos (Hamatake et al, 2009; Hernanz-Falcon et al, 2004; Percherancier et al, 2005). Los receptores de quimioquinas no son una excepción, y complejos homo- y heterodiméricos han sido estudiados en detalle. En este trabajo hemos profundizado en este análisis, observando en primer lugar que los complejos de receptores difunden en la membrana celular, y lo hacen con un patrón de confinamiento temporal en compartimentos de actina definidos por el citoesqueleto y las

proteínas de membrana que a él se asocian. Este modelo de difusión es similar al descrito para otras proteínas de membrana (Calebiro et al, 2013). El ligando promueve coalescencia temporal de dichas plataformas seguramente modificando temporalmente la polimerización de la actina de manera local, lo que facilita el reclutamiento de la maquinaria de señalización y la función final.

El trabajo desarrollado y la puesta a punto de las tecnologías empleadas permitirán en el futuro próximo un análisis más detallado de estos procesos y la identificación de las moléculas involucradas para señalar nuevas dianas con potencial terapéutico.

Sin embargo, la dimerización de estos receptores, aunque aceptada en el campo, necesita de estudios de relevancia funcional asociados, y de evidencias en tejidos “*in vivo*” para alcanzar su auténtico valor en el campo médico. La cuestión no es sencilla por cuanto las conformaciones de estos receptores son equilibrios dinámicos (Martínez Muñoz et al, 2009) definidos por los propios niveles de receptores y de ligandos que las células encuentran. De momento, en el campo de las quimioquinas no existen ligandos específicos para todas las conformaciones posibles, y llegar en experimentos “*in vivo*” a las células con dos ligandos simultáneamente es una tarea muy complicada.

Ante esta perspectiva muchos grupos de investigación analizan casos concretos en los que algunas conformaciones puedan asociarse a procesos de regulación fina de la función de las quimioquinas. En este sentido, nuestro trabajo define por primera vez que los heterodímeros pueden afectar a la afinidad con que un receptor de quimioquinas concreto une su ligando específico. Este es un hecho conocido en otros receptores, por ejemplo en el caso de los receptores opiáceos (Jordan & Devi, 1999). Además hemos visto que el heterodímero también modula la capacidad de estos receptores de activar proteína Gai, molécula señalizadora clave en la función de esta familia de receptores. Este aspecto corrobora lo ya descrito por Levoe y colaboradores para el caso de CXCR4 y CXCR7, y otorga un nuevo punto de inter-

vención en la función de las quimioquinas al plantear que puede actuarse sobre un receptor sin inhibir la unión de su ligando y conseguir un efecto similar (Levoe et al, 2009).

Finalmente el trabajo describe por primera vez la existencia de complejos triméricos de CD4/CXCR4/CCR5 en la superficie celular en ausencia de ligandos. Pero todavía más importante es que la presencia de CCR5 altera la conformación de los otros receptores, y en consecuencia la unión de cepas VIH-1 que usan CXCR4 como correceptor. Esta observación explica un hecho evidenciado hacía tiempo, por qué las cepas de virus X4 infectaban más células de pacientes CCR5Δ32, y por qué infectan mejor células Th2 que Th1 aunque los niveles de CD4 y CXCR4 sean similares (Gosselin et al, 2010; Rivino et al, 2004; Trkola et al, 2002). Además creemos que con este trabajo se establecen las bases para poder desarrollar compuestos que mimetizando el cambio conformacional promovido por CCR5 en los complejos CD4/CXCR4 pudieran ser aplicados en terapias anti-VIH.

VI.-CONCLUSIONES

VI.-CONCLUSIONES

1. El receptor EBI2 forma complejos heterodiméricos con CXCR5 en células B y modula la función de este receptor y el movimiento celular. El mecanismo implica un cambio conformacional en CXCR5 como consecuencia de su unión a EBI2 que redundaría en una reducción de la afinidad con que CXCL13 se une a CXCR5, y eficacia con la que este ligando activa la proteína G.
2. El heterodímero EBI2/CXCR5 es por lo tanto una unidad funcional que contribuye a la plasticidad de las respuestas promovidas por CXCL13 en las células B.
3. Cuando se expresan en la misma célula CD4, CXCR4 y CCR5, forman complejos heterotriméricos en ausencia de sus respectivos ligandos.
4. Formando parte de esos complejos, CCR5 inhibe la infección de cepas X4 del virus VIH-1, cepas que utilizan CD4 y CXCR4 como puerta de entrada a la célula. El mecanismo implica que la coexpresión de CCR5 modifica tanto la conformación de los homodímeros CXCR4/CXCR4 como la de los heterodímeros CD4/CXCR4. En consecuencia el complejo CD4/CXCR4/CCR5 no permite la unión de la proteína de la envuelta viral gp120, paso clave para que se desencadene la señalización necesaria para la infección viral.
5. Los agregados de CXCR4 en la membrana celular tienen un movimiento de difusión que los hace estar temporalmente confinados en un compartimento y saltar a otro compartimento adyacente donde vuelven a estar atrapados durante otro periodo de tiempo.
6. El citoesqueleto de actina no controla la dimerización de CXCR4, pero regula la difusión de los complejos de receptores en la membrana y su función.
7. CXCL12 regula la agregación de CXCR4 en un proceso dependiente del citoesqueleto de actina, y facilita de ese modo alcanzar el umbral de respuesta.

VII.-BIBLIOGRAFÍA

VII.-BIBLIOGRAFÍA

B

Aalto Y, El-Rifa W, Vilpo L, Ollila J, Nagy B, Vihinen M, Vilpo J, Knuutila S (2001) Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 deletion. *Leukemia* 15: 1721-1728

Alcami A (2003) Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol* 3: 36-50

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-511

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958

Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilaiet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3684-3689

B

Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565-568

Balabanian K, Harriague J, Decrion C, Lagane B, Shorte S, Baleux F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Chakrabarti LA (2004) CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 173: 7150-7160

Bannert N, Craig S, Farzan M, Sogah D, Santo NV, Choe H, Sodroski J (2001) Sialylated O-glycans

- and sulfated tyrosines in the NH₂-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines. *The Journal of experimental medicine* 194: 1661-1673
- Barnes PJ, Chung KF, Page CP (1998) Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 50: 515-596
- Barrero-Villar M, Cabrero JR, Gordon-Alonso M, Barroso-Gonzalez J, Alvarez-Losada S, Munoz-Fernandez MA, Sanchez-Madrid F, Valenzuela-Fernandez A (2009) Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *J Cell Sci* 122: 103-113
- Barroso R, Martinez Munoz L, Barrondo S, Vega B, Holgado BL, Lucas P, Baillo A, Salles J, Rodriguez-Frade JM, Mellado M (2012) EBI2 regulates CXCL13-mediated responses by heterodimerization with CXCR5. *Faseb J* 26: 4841-4854
- Basmaciogullari S, Pacheco B, Bour S, Sodroski J (2006) Specific interaction of CXCR4 with CD4 and CD8alpha: functional analysis of the CD4/CXCR4 interaction in the context of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Virology* 353: 52-67
- Bayburt TH, Vishnivetskiy SA, McLean MA, Morizumi T, Huang CC, Tesmer JJ, Ernst OP, Sligar SG, Gurevich VV (2011) Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *J Biol Chem* 286: 1420-1428
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM (2000) CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68: 1-8
- Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT (1997) Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* 272: 30603-30606
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17: 657-700
- Birdsall NJ (2010) Class A GPCR heterodimers: evidence from binding studies. *Trends Pharmacol Sci* 31: 499-508
- Birkenbach M, Josefsen K, Yalamanchili R, Lenoir G, Kieff E (1993) Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol* 67: 2209-2220
- Blain KY, Kwiatkowski W, Zhao Q, La Fleur D, Naik C, Chun TW, Tsareva T, Kanakaraj P, Laird MW, Shah R, George L, Sanyal I, Moore PA, Demeler B, Choe S (2007) Structural and functional characterization of CC chemokine CCL14. *Biochemistry* 46: 10008-10015
- Blanpain C, Doranz BJ, Bondue A, Govaerts C, De Leener A, Vassart G, Doms RW, Proudfoot A, Parmentier M (2003) The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle. *J Biol Chem* 278: 5179-5187
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F (1998) Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *The Journal of experimental medicine* 187: 129-134

Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M (1998) Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *The Journal of experimental medicine* 188: 2113-2125

Bulenger S, Marullo S, Bouvier M (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26: 131-137

Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA (2007) Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 110: 3316-3325

Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine* 203: 2201-2213

C

Calebiro D, Rieken F, Wagner J, Sungkaworn T, Zabel U, Borzi A, Cocucci E, Zurn A, Lohse MJ (2013) Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 743-748

Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, Cortes A, Mallol J, Fuxe K, Canela EI, Lluís C, Franco R (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 5: 727-733

Cicala C, Arthos J, Selig SM, Dennis G, Jr., Hosack DA, Van Ryk D, Spangler ML, Steenbeke TD, Khazanie P, Gupta N, Yang J, Daucher M, Lempicki RA, Fauci AS (2002) HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9380-9385

Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD (1995) Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 57: 703-711

Clerici M, Shearer GM (1993) A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 14: 107-111

Colley NJ, Cassill JA, Baker EK, Zuker CS (1995) Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3070-3074

Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I (1997) Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16: 6996-7007

Cyster JG (2005) Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23: 127-159

Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA, Ngo VN (2000) Follicu-

lar stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 176: 181-193

Chabre M, Deterre P, Antonny B (2009) The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends Pharmacol Sci* 30: 182-187

Chen C, Li J, Bot G, Szabo I, Rogers TJ, Liu-Chen LY (2004) Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor. *Eur J Pharmacol* 483: 175-186

D

de Juan D, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Hernanz-Falcon P, Serrano A, del Sol A, Valencia A, Martinez AC, Rojas AM (2005) A framework for computational and experimental methods: identifying dimerization residues in CCR chemokine receptors. *Bioinformatics* 21 Suppl 2: ii13-18

Devalaraja MN, Richmond A (1999) Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci* 20: 151-156

Doms RW, Moore JP (2000) HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* 151: F9-14

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158

E

El-Asmar L, Springael JY, Ballet S, Andrieu EU, Vassart G, Parmentier M (2005) Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol Pharmacol* 67: 460-469

Ernst OP, Gramse V, Kolbe M, Hofmann KP, Heck M (2007) Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10859-10864

F

Farzan M, Babcock GJ, Vasilieva N, Wright PL, Kiprilov E, Mirzabekov T, Choe H (2002) The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry. *J Biol Chem* 277: 29484-29489

Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H (1999) Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96: 667-676

Farzan M, Vasilieva N, Schnitzler CE, Chung S, Robinson J, Gerard NP, Gerard C, Choe H, Sodroski J (2000) A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry. *J Biol Chem* 275: 33516-

33521

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877

Fong AM, Alam SM, Imai T, Haribabu B, Patel DD (2002) CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion. *J Biol Chem* 277: 19418-19423

Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M (1996) A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87: 1037-1047

Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluís C, Fuxe K (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23: S50-59

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272

Fung JJ, Deupi X, Pardo L, Yao XJ, Velez-Ruiz GA, Devree BT, Sunahara RK, Kobilka BK (2009) Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J* 28: 3315-3328

G

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L, Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20: 2152-2159

Gatto D, Paus D, Basten A, Mackay CR, Brink R (2009) Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. *Immunity* 31: 259-269

Gatto D, Wood K, Brink R (2011) EBI2 operates independently of but in cooperation with CXCR5 and CCR7 to direct B cell migration and organization in follicles and the germinal center. *J Immunol* 187: 4621-4628

Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 20: RC110

Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, Wacleche V, El-Far M, Boulassel MR, Routy JP, Sekaly RP, Ancuta P (2010) Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol* 184: 1604-1616

Gouwy M, Struyf S, Noppen S, Schutyser E, Springael JY, Parmentier M, Proost P, Van Damme J (2008) Synergy between coproduced CC and CXC chemokines in monocyte chemotaxis through receptor-mediated events. *Mol Pharmacol* 74: 485-495

Graham GJ (2009) D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur J Immunol* 39: 342-351

Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M (2012) The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunology letters* 145: 30-38

Grosse R, Schoneberg T, Schultz G, Gudermann T (1997) Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor. *Mol Endocrinol* 11: 1305-1318

Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT (1998) A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 391: 799-803

Gurevich VV, Gurevich EV (2008) How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol Sci* 29: 234-240

H

Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J (2009) Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in targeted metastasis. *Cancer Sci* 100: 95-102

Hannedouche S, Zhang J, Yi T, Shen W, Nguyen D, Pereira JP, Guerini D, Baumgarten BU, Roggo S, Wen B, Knochenmuss R, Noel S, Gessier F, Kelly LM, Vanek M, Laurent S, Preuss I, Miault C, Christen I, Karuna R, Li W, Koo DI, Suply T, Schmedt C, Peters EC, Falchetto R, Katopodis A, Spanka C, Roy MO, Detheux M, Chen YA, Schultz PG, Cho CY, Seuwen K, Cyster JG, Sailer AW (2011) Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature* 475: 524-527

Hanson SM, Gurevich EV, Vishnivetskiy SA, Ahmed MR, Song X, Gurevich VV (2007) Each rhodopsin molecule binds its own arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3125-3128

Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP (2005) V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21: 171-189

Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, Nagler A, Lapidot T, Thelen M, Alon R (2008) A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol* 84: 1130-1140

Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS (1996) Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 271: 324-328

Heinig M, Petretto E, Wallace C, Bottolo L, Rotival M, Lu H, Li Y, Sarwar R, Langley SR, Bauerfeind A, Hummel O, Lee YA, Paskas S, Rintisch C, Saar K, Cooper J, Buchan R, Gray EE, Cyster JG, Erdmann J, Hengstenberg C, Maouche S, Ouwehand WH, Rice CM, Samani NJ, Schunkert H, Goodall AH, Schulz H, Roider HG, Vingron M, Blankenberg S, Munzel T, Zeller T, Szymczak S, Ziegler A, Tiret L, Smyth DJ, Pravenec M, Aitman TJ, Cambien F, Clayton D, Todd JA, Hubner N, Cook SA (2010) A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk. *Nature* 467: 460-464

Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 383-387

Hernanz-Falcon P, Rodriguez-Frade JM, Serrano A, Juan D, del Sol A, Soriano SF, Roncal F, Gomez L, Valencia A, Martinez AC, Mellado M (2004) Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat Immunol* 5: 216-223

Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, Wells TN (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 36: 13570-13578

Hurevich M, Ratner-Hurevich M, Tal-Gan Y, Shalev DE, Ben-Sasson SZ, Gilon C (2013) Backbone cyclic helix mimetic of chemokine (C-C motif) receptor 2: A rational approach for inhibiting dimerization of G protein-coupled receptors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 21: 3958-3966

I

Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, Bouvier M, Marullo S (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* 277: 34666-34673

J

Jarnagin K, Grunberger D, Mulkins M, Wong B, Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Diehl F, Freedman R, McCarley D, Polsky I, Ping-Tsou A, Kosaka A, Handel TM (1999) Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry* 38: 16167-16177

Jimenez-Baranda S, Gomez-Mouton C, Rojas A, Martinez-Prats L, Mira E, Ana Lacalle R, Valencia A, Dimitrov DS, Viola A, Delgado R, Martinez AC, Manes S (2007) Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol* 9: 838-846

Jones PL, Korte T, Blumenthal R (1998) Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J Biol Chem* 273: 404-409

Jordan BA, Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399: 697-700

K

Kabat D, Kozak SL, Wehrly K, Chesebro B (1994) Differences in CD4 dependence for infectivity of laboratory-adapted and primary patient isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68: 2570-2577

Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N (2009) AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol* 75: 1240-1247

Katakai T, Suto H, Sugai M, Gonda H, Togawa A, Suematsu S, Ebisuno Y, Katagiri K, Kinashi T, Shimizu A (2008) Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol* 181: 6189-6200

Kelly LM, Pereira JP, Yi T, Xu Y, Cyster JG (2011) EBI2 guides serial movements of activated B cells and ligand activity is detectable in lymphoid and nonlymphoid tissues. *J Immunol* 187: 3026-3032

Kerppola TK (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature protocols* 1: 1278-1286

Koenen RR, von Hundelshausen P, Nesmelova IV, Zernecke A, Liehn EA, Sarabi A, Kramp BK, Piccinini AM, Paludan SR, Kowalska MA, Kungl AJ, Hackeng TM, Mayo KH, Weber C (2009) Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat Med* 15: 97-103

Kofuku Y, Yoshiura C, Ueda T, Terasawa H, Hirai T, Tominaga S, Hirose M, Maeda Y, Takahashi H, Terashima Y, Matsushima K, Shimada I (2009) Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J Biol Chem* 284: 35240-35250

Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FE, Jr., Peden K, Kabat D (1997) CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71: 873-882

Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283: 74-77

Kurth J, Spieker T, Wustrow J, Strickler GJ, Hansmann LM, Rajewsky K, Kuppers R (2000) EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 13: 485-495

Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 34: 351-378

Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, Mosberg HI, Walter NG, Sunahara RK (2009) Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. *J Biol Chem* 284: 26732-26741

L

Lapham CK, Zaitseva MB, Lee S, Romanstseva T, Golding H (1999) Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat Med* 5: 303-308

Lau EK, Paavola CD, Johnson Z, Gaudry JP, Geretti E, Borlat F, Kungl AJ, Proudfoot AE, Handel TM

- (2004) Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem* 279: 22294-22305
- Laurence JS, Blanpain C, Burgner JW, Parmentier M, LiWang PJ (2000) CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding. *Biochemistry* 39: 3401-3409
- Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW (1999) Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5215-5220
- Lee CY, Ryan RJ (1973) Interaction of ovarian receptors with human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. *Biochemistry* 12: 4609-4615
- Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B (2009) CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113: 6085-6093
- Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Couturier C, Delagrangé P, Jockers R (2006) The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 25: 3012-3023
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, Dooling D, Dunford-Shore BH, McGrath S, Hickenbotham M, Cook L, Abbott R, Larson DE, Koboldt DC, Pohl C, Smith S, Hawkins A, Abbott S, Locke D, Hillier LW, Miner T, Fulton L, Magrini V, Wylie T, Glasscock J, Conyers J, Sander N, Shi X, Osborne JR, Minx P, Gordon D, Chinwalla A, Zhao Y, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson M, Baty J, Ivanovich J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Walter MJ, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456: 66-72
- Limatola C, Di Bartolomeo S, Trettel F, Lauro C, Ciotti MT, Mercanti D, Castellani L, Eusebi F (2003) Expression of AMPA-type glutamate receptors in HEK cells and cerebellar granule neurons impairs CXCL2-mediated chemotaxis. *J Neuroimmunol* 134: 61-71
- Liu C, Yang XV, Wu J, Kuei C, Mani NS, Zhang L, Yu J, Sutton SW, Qin N, Banie H, Karlsson L, Sun S, Lovenberg TW (2011) Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature* 475: 519-523
- Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391: 344-345
- Lukacs NW, Oliveira SH, Hogaboam CM (1999) Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *The Journal of clinical investigation* 104: 995-999

M

- Maggio R, Barbier P, Colelli A, Salvadori F, Demontis G, Corsini GU (1999) G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 251-257
- Mantovani A (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20: 254-257

- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27: 97-106
- Marshall FH, White J, Main M, Green A, Wise A (1999) GABA(B) receptors function as heterodimers. *Biochem Soc Trans* 27: 530-535
- Martinez Munoz L, Lucas P, Navarro G, Checa AI, Franco R, Martinez AC, Rodriguez-Frade JM, Mellado M (2009) Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers. *J Immunol* 183: 7337-7346
- Mattila PK, Feest C, Depoil D, Treanor B, Montaner B, Otipoby KL, Carter R, Justement LB, Bruckbauer A, Batista FD (2013) The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling. *Immunity* 38: 461-474
- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62: 551-577
- Mellado M, Martinez AC, Rodriguez-Frade JM (2002) Analysis of G-protein-coupled receptor dimerization following chemokine signaling. *Methods* 27: 349-357
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Martinez AC (1999) Chemokine control of HIV-1 infection. *Nature* 400: 723-724
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL, Martinez AC (2001) Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J* 20: 2497-2507
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277: 44925-44931
- Milligan G (2004) G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol* 66: 1-7
- Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez AC, Manes S, Viola A (2005) T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6: 465-471
- Moser B (2003) Chemokines: role in immune cell traffic. *Eur Cytokine Netw* 14: 204-210
- Mueller SN, Germain RN (2009) Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 618-629
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56

Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T (1998) A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol* 10: 179-185

Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M (2010) CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* 5: e9175

Nijmeijer S, Leurs R, Smit MJ, Vischer HF (2010) The Epstein-Barr virus-encoded G protein-coupled receptor BILF1 hetero-oligomerizes with human CXCR4, scavenges Gα_q proteins, and constitutively impairs CXCR4 functioning. *J Biol Chem* 285: 29632-29641

Nishita M, Aizawa H, Mizuno K (2002) Stromal cell-derived factor 1α activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Molecular and cellular biology* 22: 774-783

O

Odemis V, Lipfert J, Kraft R, Hajek P, Abraham G, Hattermann K, Mentlein R, Engele J (2012) The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia* 60: 372-381

Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 60-71

P

Paavola CD, Hemmerich S, Grunberger D, Polsky I, Bloom A, Freedman R, Mulkins M, Bhakta S, McCarley D, Wiesent L, Wong B, Jarnagin K, Handel TM (1998) Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *J Biol Chem* 273: 33157-33165

Paoletti S, Petkovic V, Sebastiani S, Danelon MG, Uguccioni M, Gerber BO (2005) A rich chemokine environment strongly enhances leukocyte migration and activities. *Blood* 105: 3405-3412

Paxton WA, Liu R, Kang S, Wu L, Gingeras TR, Landau NR, Mackay CR, Koup RA (1998) Reduced HIV-1 infectability of CD4⁺ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology* 244: 66-73

Pello OM, Martinez-Munoz L, Parrillas V, Serrano A, Rodriguez-Frade JM, Toro MJ, Lucas P, Monterrubio M, Martinez AC, Mellado M (2008) Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *Eur J Immunol* 38: 537-549

Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M, Heveker N (2005) Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 280: 9895-9903

Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG (2009) EBI2 mediates B cell segregation between the outer and

centre follicle. *Nature* 460: 1122-1126

Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D (1998) Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72: 2855-2864

Preobrazhensky AA, Dragan S, Kawano T, Gavrilin MA, Gulina IV, Chakravarty L, Kolattukudy PE (2000) Monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-terminal region. *J Immunol* 165: 5295-5303

Prinster SC, Hague C, Hall RA (2005) Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 57: 289-298

Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1885-1890

Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TN (1996) Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 271: 2599-2603

R

Rajaratnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, Baggiolini M, Clark-Lewis I (1994) Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264: 90-92

Ray P, Lewin SA, Mihalko LA, Leshner-Perez SC, Takayama S, Luker KE, Luker GD (2012) Secreted CXCL12 (SDF-1) forms dimers under physiological conditions. *Biochem J* 442: 433-442

Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Forster R, Cyster JG (2002) Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416: 94-99

Ren M, Guo Q, Guo L, Lenz M, Qian F, Koenen RR, Xu H, Schilling AB, Weber C, Ye RD, Dinner AR, Tang WJ (2010) Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J* 29: 3952-3966

Ribeiro S, Horuk R (2005) The clinical potential of chemokine receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 107: 44-58

Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J (2004) Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 200: 725-735

Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280: 1949-1953

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288: 154-157

Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martinez AC, Mellado M (1999) The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3628-3633

Romagnani S (1992) Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 98: 279-285

Rosenkilde MM, Benned-Jensen T, Andersen H, Holst PJ, Kledal TN, Luttichau HR, Larsen JK, Christensen JP, Schwartz TW (2006) Molecular pharmacological phenotyping of EBI2. An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *J Biol Chem* 281: 13199-13208

Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18: 217-242

Rottman JB, Slavov AJ, Silva R, Weiner HL, Gerard CG, Hancock WW (2000) Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *Eur J Immunol* 30: 2372-2377

Russell DW (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72: 137-174

S

Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Lagace M, Marullo S, Bouvier M (2004) Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* 279: 33390-33397

Salanga CL, Handel TM (2011) Chemokine oligomerization and interactions with receptors and glycosaminoglycans: the role of structural dynamics in function. *Experimental cell research* 317: 590-601

Salk J, Bretscher PA, Salk PL, Clerici M, Shearer GM (1993) Response. *Science* 262: 1075-1076

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR (1998) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19: 568-574

Scimone ML, Felbinger TW, Mazo IB, Stein JV, Von Andrian UH, Weninger W (2004) CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 199: 1113-1120

Schonning K, Joost M, Gram GJ, Machuca R, Nielsen C, Nielsen JO, Hansen JE (1998) Chemokine receptor polymorphism and autologous neutralizing antibody response in long-term HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 18: 195-202

Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR (2002) Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8: 68-74

Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez AC, Mackay CR, Mackay F (2007) Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14759-14764

Singh A, Besson G, Mobasher A, Collman RG (1999) Patterns of chemokine receptor fusion cofactor utilization by human immunodeficiency virus type 1 variants from the lungs and blood. *J Virol* 73: 6680-6690

Sohy D, Parmentier M, Springael JY (2007) Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J Biol Chem* 282: 30062-30069

Sohy D, Yano H, de Nadai P, Urizar E, Guillabert A, Javitch JA, Parmentier M, Springael JY (2009) Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of “selective” antagonists. *J Biol Chem* 284: 31270-31279

Springael JY, Le Minh PN, Urizar E, Costagliola S, Vassart G, Parmentier M (2006) Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol* 69: 1652-1661

Suzuki K, Ritchie K, Kajikawa E, Fujiwara T, Kusumi A (2005) Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophysical journal* 88: 3659-3680

Suzuki S, Chuang LF, Yau P, Doi RH, Chuang RY (2002) Interactions of opioid and chemokine receptors: oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells. *Experimental cell research* 280: 192-200

Svoboda P, Teisinger J, Novotny J, Bourova L, Drmota T, Hejnova L, Moravcova Z, Lisy V, Rudajev V, Stohr J, Vokurkova A, Svandova I, Durchankova D (2004) Biochemistry of transmembrane signaling mediated by trimeric G proteins. *Physiol Res* 53 Suppl 1: S141-152

Szabo I, Wetzel MA, Zhang N, Steele AD, Kaminsky DE, Chen C, Liu-Chen LY, Bednar F, Henderson EE, Howard OM, Oppenheim JJ, Rogers TJ (2003) Selective inactivation of CCR5 and decreased infectivity of R5 HIV-1 strains mediated by opioid-induced heterologous desensitization. *J Leukoc Biol* 74: 1074-1082

T

Terrillon S, Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5: 30-34

Tersmette M, de Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F (1988) Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 62: 2026-2032

Treanor B, Depoil D, Gonzalez-Granja A, Barral P, Weber M, Dushek O, Bruckbauer A, Batista FD (2010) The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor. *Immunity* 32: 187-199

Trettel F, Di Bartolomeo S, Lauro C, Catalano M, Ciotti MT, Limatola C (2003) Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J Biol Chem* 278: 40980-40988

Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, Pugach P, Xu S, Wojcik L, Tagat J, Palani A, Shapiro S, Clader JW, McCombie S, Reyes GR, Baroudy BM, Moore JP (2002) HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 395-400

U

Ugolini S, Moulard M, Mondor I, Barois N, Demandolx D, Hoxie J, Brelot A, Alizon M, Davoust J, Sattentau QJ (1997) HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 159: 3000-3008

V

Vega B, Munoz LM, Holgado BL, Lucas P, Rodriguez-Frade JM, Calle A, Rodriguez-Fernandez JL, Lechuga LM, Rodriguez JF, Gutierrez-Gallego R, Mellado M (2011) Technical advance: Surface plasmon resonance-based analysis of CXCL12 binding using immobilized lentiviral particles. *J Leukoc Biol* 90: 399-408

Venkatesan S, Petrovic A, Van Ryk DI, Locati M, Weissman D, Murphy PM (2002) Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. *J Biol Chem* 277: 2287-2301

Vischer HF, Nijmeijer S, Smit MJ, Leurs R (2008) Viral hijacking of human receptors through heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 93-97

Vischer HF, Watts AO, Nijmeijer S, Leurs R (2011) G protein-coupled receptors: walking hand-in-hand, talking hand-in-hand? *British journal of pharmacology* 163: 246-260

Vorster PJ, Guo J, Yoder A, Wang W, Zheng Y, Xu X, Yu D, Spear M, Wu Y (2011) LIM kinase 1 modulates cortical actin and CXCR4 cycling and is activated by HIV-1 to initiate viral infection. *J Biol Chem* 286: 12554-12564

W

Wang J, He L, Combs CA, Roderiquez G, Norcross MA (2006) Dimerization of CXCR4 in living malignant cells: control of cell migration by a synthetic peptide that reduces homologous CXCR4 interactions. *Mol Cancer Ther* 5: 2474-2483

Wang L, Fuster M, Sriramaraio P, Esko JD (2005) Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* 6: 902-910

Wang X, Watson C, Sharp JS, Handel TM, Prestegard JH (2011) Oligomeric structure of the chemokine CCL5/RANTES from NMR, MS, and SAXS data. *Structure* 19: 1138-1148

Wheeler D, Sneddon WB, Wang B, Friedman PA, Romero G (2007) NHERF-1 and the cytoskeleton regulate the traffic and membrane dynamics of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 282: 25076-25087

Wilson S, Wilkinson G, Milligan G (2005) The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem* 280: 28663-28674

Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330: 1066-1071

Y

Ye S, Pang H, Gu YY, Hua J, Chen XG, Bao CD, Wang Y, Zhang W, Qian J, Tsao BP, Hahn BH, Chen SL, Rao ZH, Shen N (2003) Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFIT1. *Rheumatology (Oxford)* 42: 1155-1163

Yin X, Truty J, Lawrence R, Johns SC, Srinivasan RS, Handel TM, Fuster MM (2010) A critical role for lymphatic endothelial heparan sulfate in lymph node metastasis. *Molecular cancer* 9: 316

Yoder A, Yu D, Dong L, Iyer SR, Xu X, Kelly J, Liu J, Wang W, Vorster PJ, Agulto L, Stephany DA, Cooper JN, Marsh JW, Wu Y (2008) HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* 134: 782-792

Z

Zabel BA, Lewen S, Berahovich RD, Jaen JC, Schall TJ (2011) The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Molecular cancer* 10: 73

Zhang Y, Rollins BJ (1995) A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Molecular and cellular biology* 15: 4851-4855

Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD (1993) Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 261: 1179-1181

Zhu X, Wess J (1998) Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* 37: 15773-15784

Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595-599

